



**FACULTAD DE CIENCIAS.**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR.**

**INGENIERÍA DE LA SÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS DE  
ÁCIDOS OMEGA-3 Y DE ANTIOXIDANTES  
PROTECTORES CATALIZADOS POR LIPASAS.**

**TESIS DOCTORAL.**

**Sonia Moreno Pérez.**

**MADRID, Octubre de 2015.**



**SONIA MORENO PÉREZ**

**Lda. Biología Sanitaria**



# **INGENIERÍA DE LA SÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS DE ÁCIDOS OMEGA-3 Y DE ANTIOXIDANTES PROTECTORES CATALIZADOS POR LIPASAS.**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Autónoma de Madrid**

**DIRECTORES:**

**JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJÁS**

**GLORIA FERNÁNDEZ LORENTE**

**FERNANDO LÓPEZ GALLEGO**

**Instituto de Catálisis y Petroleoquímica**

**Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación**

**C.S.I.C., Madrid**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.**



**Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular  
Madrid, 2015**





## AGRADECIMIENTOS.

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que han estado junto a mí durante estos últimos años, dándome su apoyo y brindándome su amistad.

En primer lugar a mis directores de Tesis, por su inestimable cariño y permitirme realizar junto a ellos mi trabajo doctoral. A Jose Manuel Guisan, por compartir conmigo su sabiduría, su forma de ver las cosas tan positiva y por motivarme cada día a sacar lo mejor de mí misma. A Gloria Fernández, por su gran amistad, por ayudarme en todo momento y compartir tantas vivencias juntas, incluso en los momentos más duros has sabido sacar fuerzas, y por ello te admiro. A Fernando López Gallego, por todos sus conocimientos brindados y su gran disponibilidad.

A Jose Carlos Conesa, director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Victoria Moreno Arribas, directora del Instituto en Ciencias de la Alimentación, y Aurelio Hidalgo, tutor de esta tesis doctoral, por todas las facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, así como al personal de ambos centros (Mantenimiento, Almacén, Secretaría, Unidades de Apoyo, Limpieza, etc.) por su ayuda en el día a día.

Al ministerio de España, con cuyo Contrato de Personal Investigador en Formación, ha sido posible realizar este trabajo.

A Benevides Pessela, Mari Carmen Ceinos y Roberto Munilla por toda su ayuda en el laboratorio y los buenos momentos compartido juntos.

A todos mis compañeros de laboratorio, desde los primeros como Rocio, Javi, Marco, Marzia, Claudia, Godoy, pasando por tantos amigos que han formado parte de mi vida tan sólo unos meses pero que han dejado huella en mí como Susana, Eliane, Dani, Rodrigo, Cintia, Marta, Bea, Manuela, Anca, Marilia, Karol, Maria, Natalia, Alicia y los actuales como Lara, María, Alejandro, César, Sandro, Chiara, Cristina, Bárbara, con los que me divierto tanto y mi vida en Madrid seguro que no sería la misma. También a mis compañeros de Máster Ángel, Jeni y Héctor, a mis ponzanitas, retales, a mis amigos de siempre que aunque estemos lejos siempre acabamos encontrándonos los fines de semana, y tantos otros que no cabrían en esta página, gracias a todos vosotros por ser mi pequeña gran familia durante todo este tiempo.

A mi monito por ser tan comprensivo y hacer mi vida un poquito más feliz.

A mi familia.

Y sobre todo, con todo mi corazón, a mis padres, Mariano y Lourdes, y a mi hermana, cada día que pasa os quiero con más fuerza y siento la necesidad de teneros cerca, gracias por estar junto a mí siempre y haberme apoyado en todo momento, no sabéis lo que significa para mí todos estos años de cariño, os quiero hoy y siempre.





## RESUMEN.

Los ácidos grasos poli-insaturados, especialmente los omega-3, resultan esenciales para la salud de los seres humanos en todas las etapas de su vida. Éstos son mayoritariamente abundantes en los aceites de algunos pescados. El ácido docosahexaenoico o DHA es particularmente importante para el desarrollo del cerebro, por este motivo, es un nutriente esencial durante los primeros meses de vida del neonato y por ello muchas organizaciones del ámbito de la salud recomiendan que debería incluirse en las formulas infantiles. El ácido eicosapentaenoico o EPA es muy útil para prevenir enfermedades cardiovasculares y por ello resulta fundamental en la dieta de personas en edad avanzada.

La síntesis de mezclas de derivados altamente enriquecidos en ácidos omega-3 se puede añadir a casi cualquier tipo de alimento. De este modo un ingrediente funcional presente casi exclusivamente en un alimento poco consumido (como el pescado azul) podría incorporarse a una amplísima variedad de alimentos de gran consumo (leche, yogures, galletas, bebidas refrescantes, pan, etc.) útiles para todas las edades y todas las culturas gastronómicas.

Por otro lado, los derivados de DHA y EPA se oxidan muy fácilmente, una manera de evitar este problema sería la utilización conjunta con antioxidantes liposolubles para mantener intactas sus propiedades funcionales y para no alterar las propiedades organolépticas de los alimentos a los cuales se han añadido.

Tanto la obtención de ingredientes funcionales altamente enriquecidos en ácidos omega-3 como la síntesis de los antioxidantes protectores se pueden realizar por métodos químicos convencionales o mediante procesos enzimáticos utilizando catalizadores de lipasas.

La utilización de procesos enzimáticos para la producción de ingredientes funcionales y antioxidantes nos permite obtener ambos componentes como productos “naturales”, sin contener trazas de subproductos, reactivos o disolventes tóxicos, y mediante procesos realizados en condiciones muy suaves de reacción. Para que estos procesos sean aplicables a la industria alimentaria, además de sostenibles, han de resultar muy económicos y para ello es preciso disponer de muy buenos catalizadores de lipasas inmovilizadas (a ser posible mucho mejores que los catalizadores comerciales existentes actualmente). En este caso los procesos enzimáticos serían mucho más rápidos, los medios de reacción y los reactores más sencillos y los catalizadores se podrían re-utilizar durante periodos de tiempo muy prolongados.

## **ABSTRACT.**

Polyunsaturated fatty acids, especially omega-3, are essential for human health at all stages of the life. These are principally abundant in some fish oils. Docosahexaenoic acid or DHA is particularly important for brain development, reason why , it is an essential nutrient during the first months of life, and therefore, many organizations in the field of health recommend that it should be included in infant formulas. The eicosapentaenoic acid or EPA is very useful to prevent cardiovascular diseases and consequently it is essential in the diet of elderly people.

The resulting synthesis of mixtures highly enriched in omega-3 can be added to almost any type of food. Thus a nutrient almost exclusively in food little consumed (such as oily fish) could be incorporated into a wide variety of food (milk, yogurt, cookies, soft drinks, bread, etc.) useful for gastronomy all ages and all cultures.

Furthermore, derivatives of DHA and EPA are very easily oxidized, a way to avoid this problem would be the combined use with fat-soluble antioxidants to keep intact its functional properties and to not alter the organoleptic properties of foods to which have been added.

Both the process of obtaining highly enriched functional ingredients in omega-3 and the synthesis of protective antioxidants can be performed by conventional chemical methods or by enzymatic processes using lipase catalysts.

The use of enzymatic processes for the production of functional and antioxidant ingredients allows us to obtain both components as "natural" products without traces of reactive or toxic solvents, and through processes performed under very mild reaction conditions.

To make these processes applicable to the food industry, as well as sustainable, they have to be very economical. For this reason it is necessary to have very good catalysts (better than commercial catalysts if it is possible). In this case, the enzymatic processes would be much faster; we can use simpler reaction media and reactors; and catalysts may be re-used for very long periods of time.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.- Ingredientes funcionales.....	1
2.- Omega-3. ....	1
2.1.- Importancia de los omega-3 en nuestra salud.....	2
2.2.- Incorporación de los $\omega$ -3 en nuestra dieta. ....	3
2.2.1.- De forma natural.....	3
2.2.2.- Como ingrediente funcional. ....	4
2.3.- Asimilación por parte de nuestro organismo.....	4
2.4.- Oxidación. ....	5
2.5.- Obtención de omega-3 y derivados: Ácidos, ésteres o TG. ....	6
2.5.1.- Métodos químicos. ....	6
2.5.2.- Métodos enzimáticos.....	7
3.- Biocatálisis. ....	7
3.1.- Lipasas.....	8
3.2.- Inmovilización. ....	10
3.2.1.- Inmovilización en soportes. ....	11
3.2.1.1.- Inmovilización reversible. ....	12
3.2.1.2.- Inmovilización irreversible o covalente. ....	14
3.3.- Técnicas de pre o post-inmovilización. ....	16
3.3.1.- Modificación química.....	16
3.3.2.- Modificación genética.....	18
3.3.3.- Modificación Química y Genética. ....	20
3.3.4.- Modificación físico-química. ....	20
4.- Reacciones enzimáticas para la obtención de omega-3 y derivados de interés en Tecnología de Alimentos.....	21
4.1.- Obtención de omega-3 mediante hidrólisis enzimática de aceite de pescado.....	22
4.2.- Obtención de derivados de omega-3 mediante etanolisis enzimática de aceite de pescado. ....	22
4.3.- Síntesis enzimática de triglicéridos de omega-3. ....	23
OBJETIVOS.....	24
MATERIALES.....	26

MÉTODOS. ....	31
1.- Análisis de proteínas. ....	31
1.1.- Cálculo de la concentración proteica. ....	31
1.2.- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). ....	31
2.- Determinación de la actividad de diferentes lipasas inmovilizadas y solubles. ....	31
2.1.- Cuantitativa. Hidrólisis de p-nitrofenol butirato (PNPB). ....	31
2.2.- Cualitativa. Para los mutantes de <i>Bacillus thermocatenulatus</i> 2. ....	32
2.2.1.- Hidrólisis tributirina. ....	32
2.2.2.- Hidrólisis 4-Metil umberiferil butirato (MUF). ....	33
3.- Inmovilización de lipasas. ....	33
3.1.- Inmovilización hidrofóbica. Sobre Octil-Sepharosa, Lewatit OC1600 y Sepabeads C18. ....	33
3.2.- Inmovilización iónica. Sobre Duolite A568. ....	33
3.3.- Inmovilización covalente. ....	34
3.3.1.- Multipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos glioxil. ....	34
3.3.2.- Multipuntual sobre Lewatit CNP-105 activados con grupos aldehído. ....	34
3.3.3.- Unipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (CNBr-Sepharosa). ....	35
4.- Desorción de las lipasas de soportes hidrofóbicos. ....	36
5.- Modificaciones físico-químicas de enzimas inmovilizadas. ....	36
5.1.- Aminación. ....	36
5.2.- Adsorción de polímeros. ....	36
5.3.- Succinilación. ....	37
6.- Secado de los derivados enzimáticos de lipasas para su uso en medio anhidro. ....	37
7.- Estabilidad térmica, frente a solventes o pH de las lipasas inmovilizadas. ....	37
8.- Reacciones enzimáticas catalizadas por lipasas inmovilizadas. ....	37
8.1.- Síntesis enzimática de Oleato de Ascorbilo catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	37
8.1.1.- Análisis por HPLC. ....	38
8.2.- Hidrólisis enzimática de aceite de sardina catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	38
8.2.1.- Análisis por HPLC. ....	39
8.2.2.- Cálculo de la actividad y selectividad EPA/DHA. ....	39
8.3.- Síntesis enzimática de ésteres de etilo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	39
8.3.1.- En presencia de solvente. ....	39
8.3.2.- En ausencia de solvente. ....	39

8.3.3.- Análisis por HPLC. ....	40
8.3.4.- Cálculo de la actividad y selectividad EE-EPA/EE-DHA.....	40
8.4.- Síntesis enzimática de triglicéridos de PUFAs catalizada por lipasas inmovilizadas. Interesterificación de glicerol con EEDHA.....	40
8.4.1.- Cromatografía de gases. HPLC-ELSD. ....	41
8.5.- Interesterificación de trioleína con ácido caprílico, éster metílico del ácido caprílico o tricaprilina. ....	41
8.5.1.- Cromatografía de gases. HPLC-ELSD. ....	41
8.6.- Estabilidad de los derivados acrílicos en las diferentes reacciones. ....	41
8.7.- Reutilización de los catalizadores. Ciclos de reacción.....	42
9.- Clonaje y expresión en <i>E.coli</i> de la proteína BTL2.....	42
9.1 Transformación de células competentes con el plásmido. ....	43
9.2.- Preparación de preinóculos, concentración del plásmido y glicérol. ....	43
9.3.- Expresión de la proteína BTL2.....	44
9.4.- Gel de DNA.....	44
9.5.- Purificación de BTL2.....	44
9.6.- Mutación de BTL2. ....	45
9.6.1.- Mutaciones dirigidas.....	45
9.6.2.- Mutaciones al azar. ....	45
9.7.- Modificación físico-química de mutantes con grupos químicos.....	46
9.7.1.- Introducción de puentes disulfuros y modificación con grupos químicos (Naftotiol y Alil metanotiosulfonato). ....	46
9.7.2.- Desulfuración de puentes disulfuro a enlace tioéteres. ....	47
9.7.3.- Comprobación de la modificación con el reactivo de Ellman (DTNB) y 2-PDS.....	47
RESULTADOS.....	48
1.- Síntesis enzimática de Oleato de Ascorbilo. ....	48
1.1.- Optimización de la Síntesis enzimática de oleato de ascorbilo catalizada por Novozym SP-435. ....	49
1.2.- Estudio del medio de reacción.....	49
1.3.- Temperatura óptima para la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo. ....	51
1.4.- Efecto del agua en la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo. ....	51
1.5.- Estudio de la relación molar de los sustratos utilizados en la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo.....	52
1.6.- Síntesis enzimática entre diferentes aceites y el ácido ascórbico para la obtención de un antioxidante liposoluble capaz de proteger a los PUFAs frente a la oxidación.....	53
1.7.- Influencia del catalizador en la síntesis enzimática del oleato de ascorbilo.....	53

1.8.- Influencia de la estrategia de inmovilización en la síntesis de oleato de etilo catalizada por las diferentes lipasas escogidas. ....	55
1.8.1.- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de RML. ....	55
1.8.2.- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de TLL. ....	55
1.8.3.- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de CALB. ....	56
1.9.- Influencia de la estrategia de post-inmovilización con PEI en la síntesis de oleato de etilo catalizada por las diferentes lipasas escogidas. ....	57
1.10.- Inactivación térmica de los catalizadores utilizados en la síntesis de oleato de ascorbilo. ....	58
1.11.- Conclusión/Discusión. ....	60
2.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con <i>Bacillus thermocatenulatus</i> (BTL2). ....	62
2.1.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL nativa inmovilizada mediante diferentes técnicas. ....	63
2.1.1.- Optimización de las condiciones de reacción para la hidrólisis enzimática de aceite de sardina catalizada por BTL2 nativa. ....	64
2.2.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado catalizada por derivados de BTL2 modificados. ....	66
2.2.1.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL modificada genéticamente en posiciones puntuales. ....	66
2.2.2.- Efecto de la modificación química en la superficie de BTL para la hidrólisis del aceite de sardina. ....	69
2.2.2.1.- Alil metanotiosulfonato. ....	69
2.2.2.2.- Naftaleno-tiol. ....	70
2.2.3.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL modificada genéticamente mediante mutagénesis al azar. ....	71
2.2.3.1.- Método de mutagénesis. ....	71
2.2.3.2.- Métodos de cribado molecular para seleccionar los mutantes más activos. ....	72
2.2.3.3.- Estabilidad de los mutantes seleccionados. ....	74
2.2.3.4.- Efecto de la estrategia de inmovilización para los mutantes diseñados, en la hidrólisis del aceite de sardina. ....	76
2.3.- Conclusión/Discusión. ....	77
3.- Obtención de esteres etílicos de $\omega$ -3 por etanolisis de aceite de sardina catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	80
3.1.- Efecto del disolvente sobre las propiedades catalíticas de lipasas inmovilizadas en la etanolisis del aceite de sardina. ....	81
3.2.- Efecto de la estrategia de inmovilización sobre las propiedades catalíticas de lipasas en la reacción de etanolisis de aceite de pescado. ....	82

3.3.- Efecto de la modificación fisico-química de la superficie del catalizador para la etanolisis de aceite de sardina. ....	84
3.3.1.- Estabilidad térmica de los catalizadores modificados físico-químicamente en la etanolisis de aceite de pescado. ....	86
3.4.- Conclusión/Discusión. ....	88
4.- Etanolisis de aceite de pescado catalizada por lipasas en ausencia de solventes. ....	91
4.1.- Estudio de diferentes estrategias de inmovilización en la etanolisis de aceite de pescado en ausencia de solventes orgánicos. ....	91
4.2.- Curso de la reacción de etanolisis de aceite de pescado catalizada por TLL-Sepabeads C18. ....	93
4.3.- Estudio comparativo de la estabilidad de Sepabeads-TLL en ausencia y presencia de disolvente en la etanolisis de aceite de sardina. ....	94
4.4.- Ciclos de reacción de la etanolisis de aceite de pescado, catalizado con TLL-Sepabeads C18. ....	96
4.5.- Conclusión/Discusión. ....	96
5.- Lípidos estructurados. ....	98
5.1.- Obtención de triglicéridos de $\omega 3$ . Interesterificación de glicerol con ésteres etílicos de DHA (EEDHA). ....	98
5.1.1.- Perfil de síntesis de triglicéridos con diferentes lipasas inmovilizadas. ....	99
5.1.2.- Efecto de la temperatura en la síntesis catalizada por CALB-SepabeadsC18. ....	99
5.1.3.- Síntesis del triglicérido de DHA catalizado por CALB inmovilizada en diferentes soportes. ....	100
5.1.4.- Estabilidad térmica de los mejores derivados de CALB en condiciones anhidras..101	
5.1.5.- Perfil de síntesis del triglicérido de DHA catalizado por CALB en las mejores condiciones descritas. ....	101
5.1.6.- Síntesis enzimática de monoglicérido sn-2 de DHA catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	102
5.1.7.- Conclusión/Discusión. ....	104
5.2.- Síntesis de lípidos estructurados mediante interesterificación de trioleína con ácidos grasos de cadena media. ....	106
5.2.1.- Efecto del donador de acilo en la síntesis enzimática de lípidos estructurados catalizada por lipasas inmovilizadas. ....	107
5.2.2.- Estudio de las condiciones de reacción en la interesterificación de trioleína con tricaprilina catalizada por TLL-Sepabeads C18. ....	108
5.2.2.1.- Efecto de la temperatura. ....	109
5.2.2.2.- Efecto de la relación molar TO:TC. ....	109
5.2.3.- Efecto de la estrategia de inmovilización en la interesterificación de TO con TC para TLL. ....	110



5.2.4.- Estabilidad de la interesterificación de trioleína con tricaprilina bajo las condiciones óptimas. ....	111
5.2.5.- Conclusión/Discusión.....	111
CONCLUSIONES.....	114
BIBLIOGRAFÍA.....	116
ANEXO CON ARTICULOS PUBLICADOS.....	126

## ABREVIATURAS.

2PDS: 2,2'-ditiopiridina

AC: Ácido caprílico.

BL21: Células competentes de *E.coli*.

BTL2: Lipasa de *Bacillus thermocatenulatus* 2.

CNBr ó BrCN: Agarosa activada con grupos de bromuro de cianógeno.

CALB: Lipasa de *Candida antarctica* B.

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

DH5 $\alpha$ : Células competentes de *E.coli*.

DHA: Ácido docohexaenoico.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DO: Densidad óptica.

DTT: DL-ditiotreitol.

DTNB: 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzoico).

dTNPs: Nucleótidos fosfatados.

Duo: Soporte iónico Duolite.

EE-DHA: Éster etílico del ácido docohexaenoico.

EMAC: Éster metílico ácido caprílico

EE-EPA: Éster etílico del ácido eicosapentaenoico.

EPA: Ácido eicosapentaenoico.

GRAS: Reconocido como seguro.

Km: Constante de Michaelis.

LB: Medio de cultivo Luria Bertani.

Lew 105: Soporte covalente Lewatit CNP-105.

Lew 1600: Soporte hidrofóbico Lewatit 1600.

MTS: Metanotiosulfonatos.

MUF: 4-metilumbeliferona.

MW: Molecular weight, es decir, peso molecular.

Novo. 435: Derivado comercial de Novozymes donde está CALB inmovilizada.

PEI: Polietilenimina.

PFL: Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

PMFS: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

Pnpb: Paranitrofenol butirato.

PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados.

QL: Lipasa de *Alcaligenes* sp.

RML: Lipasa de *Rizomucor mehl*.

RT: Tiempo de retención.

Sep. o Sep. C18: Soporte hidrofóbico Sepabeads C18.

TC: Tricaprilico.

TLL: Lipasa de *Thermomyces lanuginosa*.

TO: Trioleico.

UCM: Unión covalente multipuntual.

UCU: Unión covalente unipuntual.

# INTRODUCCIÓN.

## 1.- Ingredientes funcionales.

Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan un efecto beneficioso para la salud más allá de su valor nutricional básico. Resultan de la adición, sustitución o eliminación de ciertos componentes a los alimentos habituales (Marcos, Garca et al. 2007). La obtención de alimentos que contengan ingredientes funcionales muy beneficiosos para la salud, y que el ser humano no es capaz de sintetizar, constituye uno de los retos más importantes de la industria alimentaria actual. Para poder emplear estos ingredientes funcionales en la industria alimentaria, la puesta a punto de métodos sencillos y económicos para su síntesis sostenible es un objetivo indispensable y prioritario ya que es necesaria la producción de alimentos de calidad pero relativamente baratos.

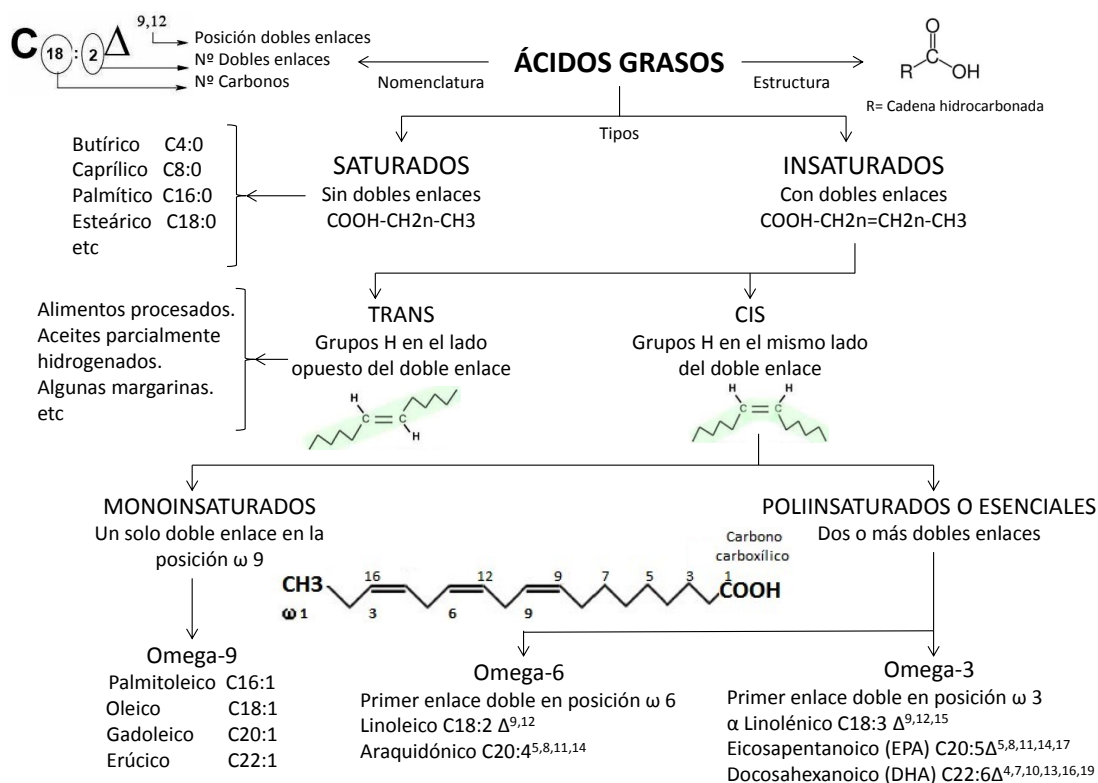
## 2.- Omega-3.

Los lípidos son esenciales para nuestro organismo, proporcionan una importante fuente de energía, son el componente principal de las membranas celulares y desempeñan papeles imprescindibles en la señalización celular así como funciones biocatalíticas y de transporte (Hausman 2010). Poseen una gran variabilidad estructural, los más simples son los ácidos grasos (AG), los cuales están constituidos por cadenas largas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo en uno de los extremos. Éstos difieren entre sí en la longitud de sus cadenas, cantidad de dobles enlaces carbono-carbono, la posición de dichos dobles enlaces en la cadena, la orientación que adquiere la molécula con ellos y la cantidad de ramificaciones que poseen. Estas diferencias se usan a la hora de nombrarlos (Horton 2008). (Figura 1)

Su estructura les confiere una naturaleza hidrofóbica, que juega un papel muy importante en sus funciones biológicas. Suelen unirse a otras moléculas formando estructuras mayores por medio de enlaces tipo éster a través del grupo carboxilo terminal, como por ejemplo los triglicéridos (TG), que desde un punto de vista alimentario son los lípidos más importantes, y están formados por tres moléculas de AG y una de glicerol (Verdú 2009).

Existe un grupo de AG denominados esenciales, que el organismo no es capaz de sintetizar y es necesario incorporarlos a través de la dieta, ya que son imprescindibles para ciertas funciones fisiológicas. Se trata de AG poliinsaturados (AGPI) con todos los

dobles enlaces en posición cis. En el ser humano existen dos grupos, los omega 6 ( $\omega$ -6) cuyo precursor es el ácido linoleico y los omega 3 ( $\omega$ -3) que provienen del ácido  $\alpha$  linolénico (ALA) (Gil 2010).



**Figura. 1-** Nomenclatura, estructuras y clasificaciones más importantes de los AG libres.

## 2.1.- Importancia de los omega-3 en nuestra salud.

En nuestros días la dieta tiende a un exceso de grasas  $\omega$ -6 y un defecto de  $\omega$ -3, los AG  $\omega$ -3 son necesarios para numerosas funciones corporales normales, como el control de coagulación de la sangre y la construcción de las membranas celulares en el cerebro, además de contribuir a la prevención de diversas enfermedades (Simopoulos 2006). Un bajo nivel de estos ácidos debido a malas dietas provoca desórdenes neuropsiquiátricos y retinopatías ya sea en neonatos, como en personas con diabetes o ancianos (Connor, SanGiovanni et al. 2007).

Dentro de los  $\omega$ -3 existen dos tipos que están muy valorados por una gran cantidad de estudios a sus espaldas. El ácido eicosapentanoico (EPA) es un precursor de una serie de eicosanoides (interleukinas y tromboxanos) muy importantes para el correcto funcionamiento del sistema nervioso central, respuesta inmune e inflamación. Es importante porque reduce la formación de triglicéridos y está asociado principalmente a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Por otro lado el ácido

docosahexanoico (DHA) forma eicosanoides como resolvinas, protectinas y lipoxinas muy relacionadas con la visión y conexiones neurológicas (Calder 2003). En la Tabla 1 se recogen algunos de sus importantes beneficios.

<b>Beneficio</b>	<b><math>\omega</math>-3</b>	<b>Organismo</b>	<b>Referencia</b>
<b>Disminuye resistencia a insulina</b>	ALA	Humano	(Vuksan et al., 2007)
<b>Reduce aterosclerosis</b>	DHA, EPA	Humano	(Dyerberg et al., 2004)
<b>Ayuda al desarrollo neural y cerebral</b>	ALA, DHA	Humano, roedores y otros primates	(Lauritzen et al., 2000; McCann and Ames, 2005)
<b>Anti cancerígeno</b>	DHA	Humano y rata	(Conklin, 2002; Holian and Nelson, 1992)
<b>Previene apoptosis</b>	DHA, EPA	Rata	(Calviello et al., 1999; German et al., 2006)
<b>Previene la inflamación</b>	ALA	Ratón y rata	(Ren et al., 2007)
<b>Incrementa la densidad ósea</b>	DHA	Humano	(Hogstrom et al., 2007)
<b>Alivia la inflamación en fibrosis cística</b>	DHA, EPA	Humano	(De Vizia et al., 2003)
<b>Combate el estrés oxidativo</b>	DHA	Humano, perro y gato	(Brown, 2008; Yavin et al., 2002)
<b>Anti-trombótico</b>	EPA	Humano	(Tamura et al., 1992)
<b>Anti-arritmia</b>	DHA, EPA	Humano	(Lombardi and Terranova, 2007; Nodari et al., 2009)
<b>Inmuno modulación</b>	DHA, EPA	Humano	(Yaqoob and Calder, 2007)
<b>Mejora la función neural, cerebral y la visión</b>	DHA, EPA	Humano	(Chen et al., 2008; German et al., 2006; Lauritzen et al., 2000; Valentine and Valentine, 2004)
<b>Mitiga los desórdenes cardiovasculares</b>	DHA, EPA	Humano	(GISSI, 1999)

**Tabla 1.-** Beneficios reportados por los AG  $\omega$ -3 más importantes (Ganesan, Brothersen et al. 2014).

Los AG  $\omega$ -6 también están implicados en la síntesis de eicosanoides pero con otras funciones y un exceso de ellos puede comprometer alteraciones cardiovasculares, neurológicas, inflamatorias, autoinmunes, etc (Granados, Quiles et al. 2006).

## 2.2.- Incorporación de los $\omega$ -3 en nuestra dieta.

El consumo de  $\omega$ -3 en España no llega al 0,5% del total de la energía que necesitamos, cuando lo recomendable es ingerir el 1% (Mataix and Gil 2004). Los especialistas recomiendan reducir el consumo de grasas saturadas e incrementar el de insaturadas, especialmente oleico y  $\omega$ -3 (Verdú 2004).

### 2.2.1.- De forma natural.

Podemos ingerir estos nutrientes, los  $\omega$ -3, de forma natural a través de fuentes animales como el pescado azul o fuentes vegetales como las semillas de lino, chía o

incluso micro algas que es a partir de donde los obtienen los pescados anteriormente mencionados. También lo contienen otros alimentos como las nueces pero en baja proporción respecto a los  $\omega$ -6 (Verdú 2009). Los pescados azules son los alimentos que tienen una mayor cantidad y proporción de EPA y DHA respecto a otros AG, los alimentos vegetales sobre todo poseen  $\omega$ -3 en forma de su precursor, ALA, que posteriormente debe ser transformado en el organismo (European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Dietetic Products 2010). La EFSA recomienda comer una cantidad de EPA+DHA de unos 250-500 mg/día para evitar ciertas patologías. Evidentemente estos alimentos no son muy comunes en algunas tradiciones gastronómicas, o puede no ser adecuada su ingesta en determinadas circunstancias, como las primeras etapas de la vida o incluso en individuos que padecen algunas enfermedades como hipercolesterinemia, diabetes, etc. Por ello cada vez más se investiga una forma adecuada de incorporar por otras vías estos compuestos tan beneficiosos para nuestra salud (Gil 2010).

### **2.2.2.- Como ingrediente funcional.**

Actualmente existen una gran variedad de alimentos enriquecidos que nos permiten poder consumir  $\omega$ -3 más fácilmente. Podemos encontrarlos en forma de cápsulas de ingestión directa (Munro and Garg 2013) o como microcápsulas adicionadas a cualquier tipo de alimento (Sanguansri, Shen et al. 2013). Los primeros preparados comercializados consistían en una base láctea enriquecida en  $\omega$ -3, procedentes de aceites vegetales y de pescado; después se desarrollaron margarinas, aceites, galletas, etc., con contenidos incrementados en ácidos  $\omega$ -3 de cadena corta o larga. También modificando la alimentación de ciertos animales como las aves se puede conseguir que la carne y los huevos que se comercializan tengan niveles altos de ácidos  $\omega$ -3. Además se han desarrollado productos cárnicos con incorporación de aceites, dirigida a que la relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 aumente (Juárez 10-13 09, 2007).

### **2.3.- Asimilación por parte de nuestro organismo.**

Hay que tener en cuenta el correcto procesado de estos compuestos en el aparato digestivo. Las grasas se ingieren principalmente en forma de AG libres y TG que son degradados por diferentes lipasas del tracto digestivo hasta AG libres, mono y diacil gliceroles que se absorben a través del epitelio intestinal. Hay numerosos estudios para ver cómo afecta a la absorción los nuevos suplementos alimentarios que existen. La ingestión de omega-3 en forma de TG se considera nutricionalmente más favorable que los metil o etil esteres ya que se los considera más “naturales” (Shahidi and

Wanasundara 1998). También la posición que ocupe el  $\omega$ -3 en el TG es importante, ya que hay estudios que señalan diferencias en cuanto a biodisponibilidad en el tracto digestivo, pareciendo más adecuada la posición sn-2 del TG, ya que es más fácilmente absorbida en el intestino (Valenzuela, Valenzuela et al. 2005).

## 2.4.- Oxidación.

El EPA y DHA son muy sensibles al oxígeno, luz, temperatura y algunos agentes químicos y microbianos. La oxidación de los lípidos es un proceso en cadena a través de radicales libres, se inicia con su peroxidación y su velocidad aumenta con el grado de insaturación (Wong and Lorenzo 1994). La oxidación hace que estos compuestos generen olores desagradables, un sabor rancio y se vean alteradas sus propiedades perdiendo determinados nutrientes y pudiéndose llegar a formar sustancias nocivas como hidroperóxidos dándose polimerización y deposición de los compuestos (Shahidi 2005). Aunque estos hidroperóxidos no se absorben en gran cantidad a nivel oral se les ha relacionado con enfermedades degenerativas y pueden dar lugar a compuestos secundarios que también pueden resultar dañinos como compuestos aldehídicos y epoxiácidos (Spiteller 1998).

Una posible manera de evitar dichos problemas a la hora de incorporar estos AGPI a los alimentos es el uso conjunto de un antioxidante. Actualmente existen antioxidantes tanto naturales como sintéticos. Entre los naturales se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E (o tocoferoles) y provitamina A, y entre los sintéticos butil-hidroxitolueno (BHT; E321), butil-hidroxianisol (BHA; E 320), t-butil-hidroquinona (TBHQ), etoxiquina (EQ) y galato de propilo (E 310) (Madhavi, Deshpande et al. 1995). Los sintéticos tienen una serie de limitaciones y pueden dar problemas de mutagenicidad, teratogenicidad u otros problemas patogénicos (Bailey, Swern et al. 1985).

El ácido ascórbico es un excelente agente antioxidante, el problema que tiene para ejercer su efecto en grasas es su hidrosolubilidad, necesitamos hacerle liposoluble para mezclarle con los omega-3. La esterificación del ácido ascórbico con un ácido graso permite una mayor solubilidad de este compuesto en medios grasos. Está estudiado que el palmitato de ascorbilo (E 304) posee un efectivo poder antioxidante para las grasas comestibles incluso a altas temperaturas (Madhavi, Deshpande et al. 1995) y está aprobado para usarse en la industria alimentaria como GRAS.

El proceso de síntesis del E-304 normalmente se ha llevado a cabo mediante síntesis química con la utilización de ácido sulfúrico y un complejo proceso de purificación



posterior (Stamatis, Sereti et al. 2001), o mediante la síntesis enzimática de compuestos intermedios como etil o vinil ésteres como donadores de grupos acilo (Yan, Bornscheuer et al. 1999).

### 2.5.- Obtención de omega-3 y derivados: Ácidos, ésteres o TG.

Los complementos dietéticos de  $\omega$ -3, ya sea en forma de cápsulas de ingestión directa o de nano cápsulas incorporadas en otros alimentos, se someten a una serie de procesos para aislar y purificar los  $\omega$ -3 en forma de AG libres, alquil ésteres (ésteres etílicos o metílicos) o triglicéridos. Esto se debe a que en el aceite de pescado vamos a encontrar gran variedad de lípidos de diferente tipo, no sólo AGPI (Gil 2010), y otras sustancias. En el mercado existen cápsulas de aceite de pescado con alto contenido en omega-3 pero también pueden contener cantidades muy altas de ciertas vitaminas como A y D, colesterol y otros AG, y esto puede suponer un problema a nivel de toxicidad en el organismo (Srigley and Rader 2014).

Los métodos para producirlos son variados: Cromatografía en columna, destilación, cristalización, extracción con fluidos supercríticos, complejos de urea o métodos enzimáticos. Todos ellos poseen una serie de ventajas e inconvenientes (Shahidi and Wanasundara 1998). La mayoría suelen utilizar un catalizador, químico (un ácido o una base) o biológico (una enzima lipolítica) que acelera la reacción sin sufrir cambios químicos. Las industrias que demandan estos productos, que son la farmacéutica y alimentaria, demandan cada vez más aspectos de biocompatibilidad y medioambientales.

#### 2.5.1.- Métodos químicos.

Los métodos químicos aunque son más baratos presentan los inconvenientes de que no son específicos para formar el producto deseado pudiendo llegar a formarse productos secundarios que pueden ser tóxicos, necesitan complejos procesos de purificación y utilizan unas condiciones de reacción muy agresivas (altas temperaturas o uso de compuestos peligrosos). Se pueden encontrar complementos dietéticos en el mercado enriquecidos en  $\omega$ -3, pero que también contienen otros AG e incluso los isómeros trans de EPA y DHA entre un 0.1 y 2,8% del total de AG y que no se sabe qué repercusiones pueden tener en la salud ya que no existen muchos estudios sobre ellos. Estos isómeros suelen formarse cuando se los somete a altas temperaturas (entre 180 y 250°C) (Srigley and Rader 2014). Por ello es muy importante el método escogido a la hora de sintetizar estos suplementos alimentarios.

### 2.5.2.- Métodos enzimáticos.

Por otro lado los métodos enzimáticos utilizan catalizadores “naturales”. El uso de biocatalizadores enzimáticos frente a catalizadores químicos presenta una gran cantidad de ventajas para llevar a cabo una química sostenible (Leresche and Meyer 2006, Woodley 2008, Wohlgemuth 2010):

- Pueden trabajar en medios acuosos, por lo que se puede evitar el uso de solventes orgánicos.
- Pueden utilizar recursos renovables.
- Se pueden modificar alterando las propiedades catalíticas para mejorar el proceso.
- Elevada especificidad (catalizando una reacción química entre muchas posibles) y selectividad (químio-, regio- y enantioselectividad) realizando una sola transformación química de entre varias posibles a un solo grupo funcional o enlace de una molécula para dar lugar a un solo producto de entre varios posibles, por lo que se obtienen los productos deseados sin la formación de subproductos secundarios.
- Actúan bajo condiciones suaves de reacción (temperatura ambiente, presión atmosférica y pH neutro), que no alteran las propiedades de los compuestos utilizados y disminuye los requerimientos energéticos.
- Aceptabilidad medioambiental, ya que al ser compuestos biológicos se degradan completamente en el medio. Además se caracterizan por poder reducir el uso de materiales peligrosos
- Gran eficiencia catalítica. Teniendo en cuenta que el principal objetivo de cualquier proceso de biotransformación es obtener una elevada conversión del sustrato en producto en el mínimo tiempo posible. Son muy activas, se obtienen altos rendimientos debido a la selectividad y las condiciones suaves de reacción.

### 3.- Biocatálisis.

Por todo lo comentado anteriormente, las enzimas son candidatos casi ideales para ser catalizadores de uso industrial, capaces de sintetizar compuestos muy complejos, compatibles con las exigencias de alta eficacia y eficiencia de los procesos químicos y de la química sostenible.

Tradicionalmente las enzimas eran extraídas de su fuente natural, por ejemplo algún tejido animal o humano. Sin embargo en la mayoría de los casos industriales, las

enzimas son producidas por microorganismos. Estos microorganismos utilizados en la producción de enzimas no son patógenos ni tóxicos. Además éstos se pueden cultivar en gran escala en un corto espacio de tiempo bajo métodos de fermentación bien establecidos. De acuerdo a lo anterior, estos microorganismos pueden producir una cantidad abundante y regular de la enzima requerida de acuerdo a cada aplicación (Hasan, Shah et al. 2006).

### 3.1.- Lipasas.

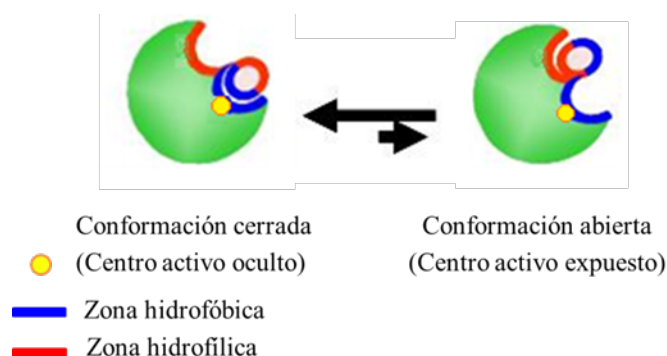
Las lipasas (acilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) constituyen el grupo de enzimas más importantes a nivel de biocatalizadores biotecnológicos en una gran variedad de procesos industriales debido a su alta versatilidad, como detergentes, alimentación, compuestos farmacéuticos, biocombustibles, cosméticos, perfumería, biosensores, etc (Sharma, Chisti et al. 2001). Esto se debe a que son muy estables en solventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen un gran rango de sustratos y presentan una alta enantioselectividad entre otras características (Jaeger and Reetz 1998).

Se encuentran libremente en la naturaleza y su acción fisiológica es la de actuar como catalizadores en reacciones lipolíticas (catabolismo de grasas y aceites) a través de la hidrólisis de los enlaces éster de acilgliceroles para dar diacilglicéridos, monoacilglicéridos, AG libres y glicerol (Nelson D. L. 2006). A parte, en medios no acuosos son capaces de llevar a cabo una gran cantidad de reacciones de síntesis tales como esterificación, interesterificación y transesterificación. Lo que determina que se dé su acción natural de hidrólisis o la inversa de síntesis viene determinado por la actividad del agua en el medio de reacción (Zaks and Russell 1988).

Las enzimas se pueden producir directamente en el laboratorio a partir del organismo productor o si se dispone del gen que codifica la proteína inserto en un plásmido, si no también se pueden adquirir preparaciones comerciales. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se han utilizado varias lipasas comerciales y una lipasa de un microorganismo termófilo de producción propia. Las enzimas de microorganismos termófilos son muy interesantes por su termoestabilidad a temperaturas superiores a los 50°C, ya que está asociada a una alta resistencia a la proteólisis, a la inactivación en presencia de disolventes orgánicos, a su resistencia a otros agentes químicos desnaturizantes, a pHs, presiones y concentraciones salinas extremas, a la posibilidad de almacenar durante tiempos prolongados y a reducir el riesgo de contaminación durante los procesos (Pennisi 1997, Niehaus, Bertoldo et al. 1999). Esta estabilidad es más alta que en sus homólogos mesófilos, llegando a ser de

especial interés para aplicaciones industriales (Daniel and Cowan 2000). Actualmente la mayoría de lipasas termófilas que han sido purificadas o caracterizadas provienen de *Bacillus* (Sharma, Soni et al. 2002), no obstante también existen lipasas provenientes de otros microorganismos como *Pyrococcus* (Haki and Rakshit 2003).

Las propiedades de las lipasas son dependientes de las condiciones del medio, ya que cualquier cambio en pH, fuerza iónica, temperatura o solventes pueden influir en las propiedades de la lipasa debido a su complejo mecanismo de acción que involucra significativos cambios conformacionales en la estructura enzimática afectando el equilibrio conformacional entre la estructura abierta y cerrada (Brzozowski, Derewenda et al. 1991, Derewenda, Brzozowski et al. 1992, Palomo, Segura et al. 2004). En medio acuoso se encuentran en un cierto equilibrio entre una conformación cerrada (forma inactiva) y otra conformación abierta (forma activa), mayoritariamente desplazado hacia la conformación cerrada (Jutila, Zhu et al. 2000). Este hecho se da gracias a una tapadera o lid que está constituida por aminoácidos que forman una estructura terciaria helicoidal y anfipática que en estado inactivo permanece protegiendo al centro activo o bolsillo hidrofóbico, mientras que en presencia de sustrato se desplaza a la forma abierta quedando expuesto el centro catalítico al medio y quedando así la enzima de forma activa como se puede ver en la Figura 1.1. Sin embargo, en presencia de una interfase hidrofóbica sufren lo que se conoce como “activación interfacial”, dando lugar a la fijación de la conformación abierta sobre dicha interfase (Verger 1997). Este fenómeno se puede producir por diferentes interfases hidrofóbicas (sustratos, soportes, detergentes...) pero también por la misma lipasa dando lugar a estructuras diméricas (Fernández-Lorente, Palomo et al. 2003, Palomo, Fuentes et al. 2003). Esta activación interfacial suele ir acompañada de un incremento de la actividad enzimática denominado hiperactivación. La gran afinidad de las lipasas por superficies hidrofóbicas ha sido usada como una herramienta útil para la purificación de este tipo de enzimas (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).



**Figura 1.1.-** Mecanismo de apertura y cierre de la tapadera de una lipasa en medio acuoso. El centro activo representado en amarillo se encuentra en una cavidad hidrofóbica.

Las lipasas tienen un rango de peso molecular entre 19 y 60 kDa. Poseen una estructura tridimensional en forma de  $\alpha/\beta$  hidrolasa que consiste en un núcleo  $\beta$  hidrofóbico, formado por varias láminas  $\beta$ , y conectado hasta con seis  $\alpha$  hélices. (Jaeger and Reetz 1998). En su centro activo presentan una tríada catalítica compuesta por una serina, una histidina y un aspártico o glutámico compartiendo homología con las serín-proteasas en este aspecto pero no estructuralmente. En su conformación activa, las lipasas presentan en su centro activo un grupo de residuos hidrofóbicos dispuestos alrededor de la serina catalítica que constituyen una región electrofílica conocida como cavidad oxianiónica (Grochulski, Li et al. 1994). Cuando se coloca un inhibidor de la serina, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMFS), se da una pérdida de actividad corroborando que este aminoácido es imprescindible para la función catalítica (Brady, Brzozowski et al. 1990).

### 3.2.- Inmovilización.

En el uso de enzimas solubles a nivel industrial sus excelentes propiedades se ven difuminadas debido a ciertos factores como la agitación mecánica, disolventes, altas temperaturas, pH extremos o por elevadas concentraciones de sustratos y productos, que provocan varios problemas (Zaks 2001, Illanes and Wilson 2003):

- Baja estabilidad, pudiendo suponer la disminución de las propiedades catalíticas y que dificulta su almacenamiento, además de su reutilización en sucesivos ciclos de reacción.
- Su solubilidad, lo que dificulta en primer lugar su separación del medio de reacción y en segundo lugar también su reutilización.

Para solucionar estos problemas de estabilidad y reutilización se han desarrollado a lo largo de años nuevas técnicas que pretenden mejorar las propiedades biocatalíticas de las enzimas. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la inmovilización, técnicas de modificación química y manipulación genética, entre otras (Ó'Fágáin 2003).

La inmovilización consiste en la unión de las proteínas de diferentes formas para hacerlas insolubles y poder reutilizarlas un gran número de veces en un sistema continuo, almacenarlas sin que se contaminen, a la vez que poder separarlas fácilmente del producto de reacción (Sheldon 2007). La inmovilización soporte-enzima puede establecerse mediante interacciones físicas o químicas (Hartmeier 1985). Una

forma posible de clasificar los diferentes tipos de inmovilización puede ser: unión a soportes, atrapamiento o encapsulación y entrecruzamiento (Sheldon 2007).

### 3.2.1.- Inmovilización en soportes.

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado diferentes metodologías que permiten inmovilizar proteínas sobre soportes sólidos preexistentes de forma controlada y dirigida a través de diferentes zonas de su superficie (aquellas con mayor densidad de cargas positivas o negativas, las zonas más hidrofóbicas, con mayor densidad de histidinas, de lisinas, etc). Además, es posible, controlando el grado de activación del soporte y las condiciones de inmovilización, controlar el grado de unión enzima soporte y por lo tanto la rigidez de la zona inmovilizada.

Las propiedades de los derivados enzimáticos (enzima inmovilizada) vienen determinadas tanto por las características de la enzima como por las del soporte sobre el que se inmoviliza. La interacción entre ambos dará lugar a un derivado enzimático con propiedades químicas, bioquímicas y mecánicas distintas (Tischer and Kasche 1999). Como para otros procesos físicos o químicos, tanto la velocidad como el rendimiento de la inmovilización vienen determinados por distintos parámetros entre los que se encuentran: el tipo de soporte, el método elegido de inmovilización, la concentración de enzima y de grupos reactivos en el soporte, el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Buchholz 1979).

Teniendo en cuenta los grandes cambios conformacionales que implican el mecanismo de apertura y cierre de las lipasas, el hecho de preparar derivados inmovilizados de lipasas, implicando zonas más o menos alejadas del centro activo, confiriendo más o menos rigidez o alterando el microambiente, podría alterar en gran medida sus propiedades catalíticas e incluso su interacción con el medio de reacción. De esta forma, diferentes derivados de una misma lipasa podrían tener unas propiedades catalíticas muy diferentes (Carmona 2003).

La elección del tipo de inmovilización ha de tener en cuenta las condiciones de la reacción, la enzima que se va a utilizar y el tipo de sustrato (Mateo, Palomo et al. 2007). Inmovilización no implica estabilización, por lo tanto es muy importante la selección del sistema de inmovilización adecuado para lograr una estabilización de la estructura terciaria de la proteína y evitar su desnaturalización que nos llevaría a la inactivación enzimática (Illanes 1999).

Es importante que el soporte tenga una gran superficie para poder inmovilizar una gran cantidad de proteína, esto se puede conseguir con soportes porosos o de grandes dimensiones para evitar posibles problemas de difusión. Además el material del que se encuentran hechos debe de ser química y mecánicamente resistente (Hanefeld, Gardossi et al. 2009). La naturaleza del material del que forma parte el soporte también es importante ya que por ejemplo en reacciones en las que sea necesaria la ausencia de agua tendrán que ser anhidros. Los soportes porosos permiten tener a las enzimas dispersas sin que se den fenómenos de agregación, además están protegidas frente a componentes externos como proteasas, burbujas o solventes que afecten a sus propiedades (Mateo, Palomo et al. 2007).

Una de las ventajas que puede conllevar la inmovilización es el incremento de la estabilidad debido a un mantenimiento de la estructura terciaria de la enzima, sobre todo, en la que están implicados enlaces de tipo irreversible; a una protección frente a las proteasas; a que evita la agregación intermolecular; y a que existe una alteración del micro entorno de la enzima (como contenido de oxígeno, agua o pH) respecto al resto del medio (Klibanov, Kaplan et al. 1978, Klibanov 1983).

La actividad enzimática puede verse afectada por la técnica de inmovilización utilizada, pudiendo aumentar, disminuir e incluso inactivarse si la interacción distorsiona demasiado la estructura terciaria o residuos catalíticos, no se produce bien la unión del sustrato al centro activo o las condiciones de inmovilización dan lugar a la desnaturalización o inactivación enzimática. Los cambios en la actividad que no la pérdida de ella se suelen deber a efectos difusionales, electrostáticos, estéricos y/o del micro entorno (Arroyo 1998).

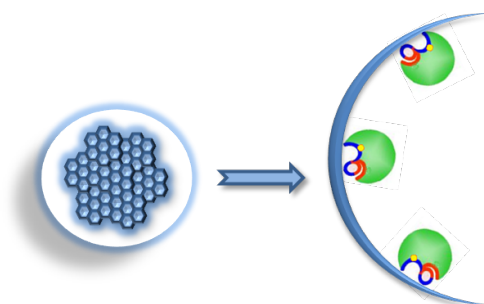
La unión soporte-enzima puede clasificarse en dos tipos: reversible o irreversible.

### **3.2.1.1.- Inmovilización reversible.**

En el método de inmovilización reversible, las enzimas inmovilizadas pueden ser desprendidas del soporte bajo condiciones no extremas. El uso de métodos reversibles para la inmovilización de enzimas es altamente atractivo, principalmente por razones económicas debido a que el soporte puede regenerarse y recargarse con enzimas nuevas cuando la actividad enzimática decae (Gupta and Mattiasson 1992), pudiendo ser reutilizado, en principio de forma indefinida, y el único residuo generado sería la solución de enzima inactivada y la sal o detergente (Klibanov 1983, Mateo, Abian et al. 2000). Los protocolos de inmovilización son generalmente simples, basta poner en contacto la enzima con el soporte bajo condiciones suaves de reacción. Esta

inmovilización se da debido a que la proteína forma enlaces débiles como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas con el soporte. Aunque estas fuerzas son débiles, si abundan, son suficientes para generar una unión estable entre la enzima y el soporte. Sin embargo con la inmovilización reversible no se pueden alcanzar grandes factores de estabilización debido a que no son capaces de rigidificar la estructura terciaria (Torres, Mateo et al. 2002, Torres, Pessela et al. 2004). En función del tipo de soporte vamos a poder establecer una estrategia de inmovilización diferente.

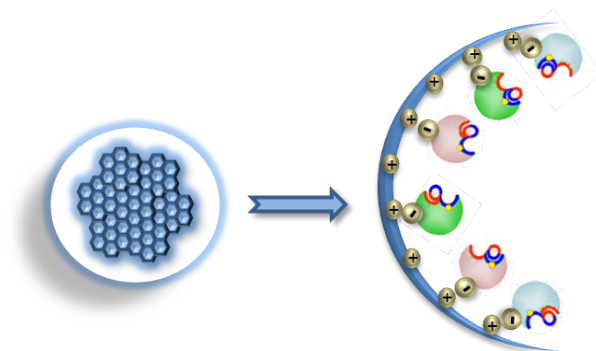
En soportes de naturaleza hidrofóbica como el Octyl-Sepharose, Lewatit 1600 o Sepabeads C18, la enzima se orienta sobre el soporte de inmovilización por el centro activo ya que es la zona más rica en residuos hidrofóbicos, las lipasas inmovilizadas permanecen con el centro activo abierto por lo que pueden incrementar su actividad, dándose un fenómeno de “hiperactivación”. El centro activo suele quedar en parte protegido debido a que se crea alrededor de él un entorno hidrofóbico que lo protege frente a las condiciones del medio (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).



**Figura 1.2.-** Adsorción hidrofóbica de una lipasa en un soporte poroso a través del centro activo.

La inmovilización por intercambio iónico se da por adsorción de grupos químicos cargados de la superficie enzimática, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El soporte puede estar cargado positiva o negativamente, por ejemplo el soporte Duolite tiene en su superficie cargas positivas (sulfonatos) (Marquez, Cabral et al. 2008) y el soporte Carboximetil (CM) cargas negativas ( $\text{O-CHO-COO}^-$ ) (Montes, Grazu et al. 2006). Es importante escoger la carga del soporte dependiendo de los grupos más abundantes en la superficie de nuestra enzima por donde queramos orientar la inmovilización. La desorción de la enzima se produce a altas concentraciones de sal o variando el pH. Si se quiere lograr la inmovilización sobre este tipo de soportes de intercambio iónico, la proteína debe presentar zonas donde la carga superficial esté localizada y sea complementaria a la carga del soporte.





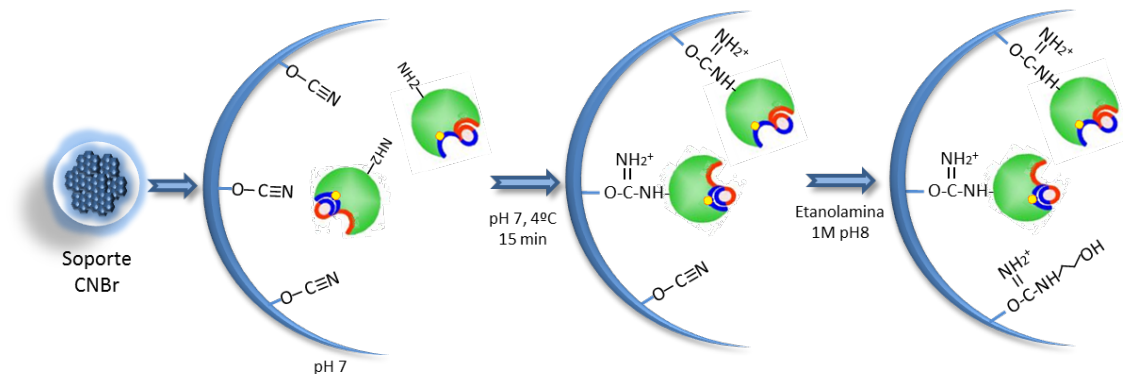
**Figura 1.3.-** Interacción iónica de varias lipasas con un soporte poroso y catiónico a través de las zonas más ricas en cargas negativas.

### 3.2.1.2.- Inmovilización irreversible o covalente.

Los enlaces que se forman son fuertes y estables, supone la unión irreversible entre enzima y soporte, impidiendo que la enzima se libere al medio de reacción (Leckband and Langer 1991, Faber 2011). Para obtener un elevado rendimiento de inmovilización, es importante que los aminoácidos esenciales para la catálisis no estén involucrados. La unión puede establecerse a través de grupos funcionales que están presentes en la superficie del soporte activado y las cadenas laterales de los aminoácidos accesibles en la superficie proteica (grupos  $\text{NH}_2$  de las lisinas,  $\text{SH}$  de las cisteínas,  $\text{OH}$  de tirosinas y serinas,  $\text{COOH}$  de aspárticos y glutámicos). De este modo, se une la enzima irreversiblemente al soporte a través de enlaces tipo amida, tio-éter, éter, enlaces carbamatos, etc (Srere and Uyeda 1976). Esta unión ha permitido en numerosas ocasiones modificar las propiedades de la enzima inmovilizada con respecto a la enzima soluble, tales como mejorar su eficiencia catalítica (aumento de  $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ) (Clark and Bailey 1983) o mejorar su estabilidad frente a agentes distorsionantes (Guisan, Alvaro et al. 1993, Bolivar, Wilson et al. 2006, Cunha, Fernández-Lorente et al. 2008). Como inconveniente, una vez que la actividad enzimática desaparece, el derivado completo deberá ser desechado. Esta unión puede ser por uno o varios puntos dependiendo del número de residuos implicados, que dependerá en parte de las condiciones de inmovilización.

Cuando la enzima se encuentra unida por uno o pocos puntos al soporte, se dice que la unión es unipuntual (UCU). Esto ocurre por ejemplo cuando utilizamos soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno ( $\text{CNBr}$ ), el cual posee en su superficie grupos cianatos activados que van a reaccionar a  $\text{pH} 7$  con el amino terminal de la lipasa, además la inmovilización se dará en frío y durante poco tiempo para evitar que se produzcan más interacciones (figura 1.4). Gracias a este tipo de inmovilización

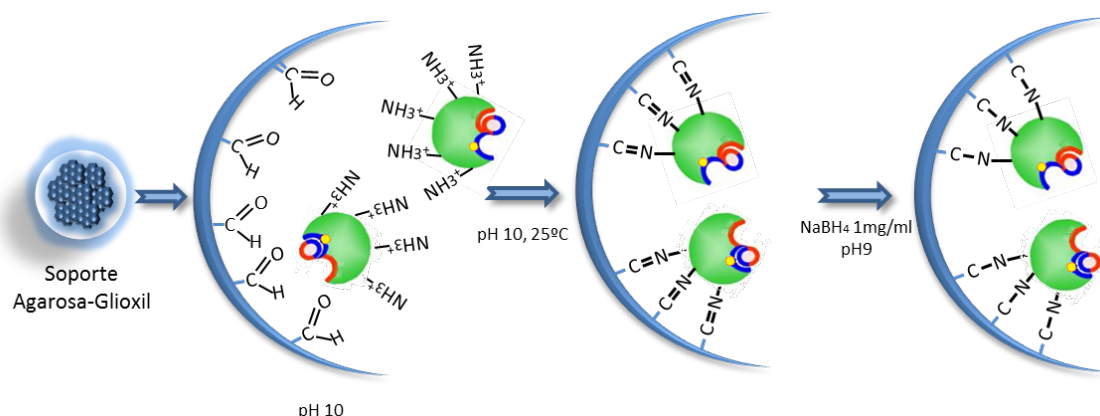
podemos simular el comportamiento de la enzima libre en cuanto a estabilidad u otras características propias ya que la estructura de la enzima no se está alterando y no hay problemas de agregación de unas con otras.



**Figura 1.4:** UCU de una lipasa a un soporte (CNBr) con grupos cianatos activados en su superficie.

Cuando la enzima se encuentra unida al soporte por muchos residuos, la posición relativa de los mismos permanece inalterada durante los posibles cambios conformacionales causados por cualquier agente distorsionante (calor, pH, disolventes orgánicos, etc) (Klibanov 1983). De esta manera, la estabilidad de una enzima unida de forma covalente multipuntual (UCM) al soporte es, por lo general, mayor que la de la enzima soluble y mayor que la de la enzima unida al soporte por uno o pocos residuos (unión unipuntual) (Martinek, Klibanov et al. 1977, Guisán 1988, Mateo, Abian et al. 2005). La UCM también puede afectar bastante a la actividad, ya que puede producir distorsiones conformacionales que pueden afectar al centro activo u otras regiones importantes para la catálisis (Klibanov 1983). Una vez el enzima es inmovilizado la ventaja que tiene es que puede ser más estable, las uniones permanecen invariables frente a las condiciones exteriores, no modificándose más la conformación de la proteína. La longitud de los brazos espaciadores entre la enzima y el soporte también afecta, si estos son cortos la enzima inmovilizada poseerá mayor rigidez de unión y estabilidad (Mateo, Palomo et al. 2006). Así por ejemplo en un soporte en el cual tenemos grupos aldehído activados en la superficie, como es por ejemplo la agarosa-aldehído (Glioxil), a pH 10 podrá interaccionar tanto el amino terminal de la lipasa como el resto de los grupos amino de las lisinas de la superficie enzimática. Si dejamos que interaccionen durante bastante tiempo, siguiendo el curso de inmovilización, irán aumentando el número de uniones enzima-soporte, cuando la enzima está inmovilizada suficientemente sin haber perdido demasiada actividad se procede a adicionar un compuesto que reduce los enlaces, borohidruro de sodio

( $\text{NaBH}_4$ ), y los hace irreversibles al mismo tiempo que se bloquean los grupos reactivos del soporte que no hubiesen interaccionado con la enzima.



**Figura 1.5.-** UCM de una lipasa a un soporte (Agarosa-aldehído) con grupos aldehído activados en su superficie.

Los grupos enzimáticos implicados en la inmovilización dependerán de los grupos activados en la superficie del soporte, en la Tabla 1.1 aparecen algunos ejemplos.

Soporte	Grupos activados	Grupos enzimáticos	Aminoácidos	pH y T <sup>a</sup> inmov. Agente adición posterior
Glioxil	Aldehídos	Aminos	Lisinas	pH10, 25°C Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ )
BrCN	Cianatos	Aminos	Lisinas	pH7, 4°C Etanolamina
Glutaraldehído	Aldehídos	Amino terminal	Lisina terminal	pH7-8

**Tabla 1.1.-** Ejemplos de algunos soportes en los que las enzimas se inmovilizan covalentemente dependiendo de los grupos químicos que se encuentran activados en la superficie del soporte.

### 3.3.- Técnicas de pre o post-inmovilización.

Existen técnicas adicionales a la inmovilización que nos pueden ayudar a mejorar aún más las propiedades catalíticas, ya que en determinadas condiciones las proteínas inmovilizadas pueden ser inestables o presentar baja o nula actividad y/o selectividad. Estas modificaciones suelen ser químicas o genéticas (Cowan and Fernandez-Lafuente 2011).

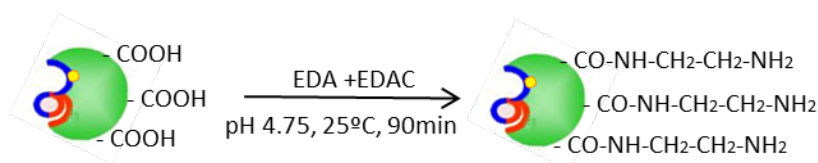
#### 3.3.1.- Modificación química.

La modificación química es una forma sencilla y rápida de obtener biocatalizadores mejorados. No es necesario conocer la estructura tridimensional de la proteína, se pueden modificar los grupos reactivos de la superficie, incluso aquellos

imprescindibles para su plegamiento, ya que la modificación se realiza en la forma ya plegada. Las desventajas que puede tener la modificación química respecto a la genética es que es necesaria realizar la modificación en todas las ocasiones que preparamos el catalizador y que no puede ser dirigida a un determinado residuo (Davis 2003, Cowan and Fernandez-Lafuente 2011, Díaz-Rodríguez and Davis 2011).

Las enzimas pueden modificarse químicamente antes o después de su inmovilización. La modificación previa de la enzima soluble permite mejorar la inmovilización, debido a que se pueden introducir grupos que eran escasos en la superficie enzimática reforzando la unión al soporte de interés (Palomo, Fernández-Lorente et al. 2007) o simplemente la mejora de su estabilidad, debido a la prevención de su inactivación o agregación. Las modificaciones posteriores se suelen realizar para intentar incrementar sus propiedades tales como la selectividad o estabilidad (Rodrigues, Berenguer-Murcia et al. 2011).

Una de las modificaciones más utilizadas es la introducción de cargas en la superficie enzimática. Esta estrategia puede ayudar a la inmovilización ya que aumenta el número de grupos que pueden reaccionar con el soporte y también a posteriori ya que provoca un cambio en la carga neta de la proteína, modificando las interacciones que mantiene la estructura de la enzima haciendo que puedan variar las propiedades biocatalíticas (Cabrera, Fernandez-Lorente et al. 2009). Se puede llevar a cabo la aminación química de los grupos carboxilos de la superficie enzimática (Asp y Glu) con 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) en presencia de etilendiamina (EDA) (Hoare and Koshland Jr 1967). Esta reacción permite la formación de un enlace amida entre el carboxilo activado por EDAC y la EDA dejando un amino primario libre y expuesto al medio (figura 1.6).

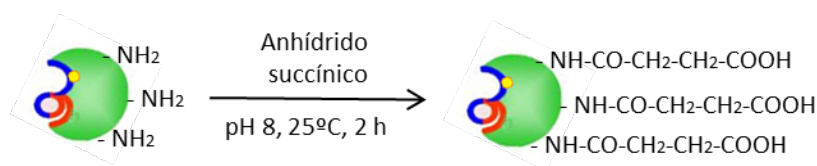


**Figura 1.6.-** Aminación química de una lipasa.

Estos aminos primarios introducidos químicamente tienen un pK más bajo que los aminos de las lisinas, por lo tanto los aminos primarios resultantes de la modificación química son más reactivos (López-Gallego, Montes et al. 2005). Además mediante esta estrategia se puede controlar el grado de modificación química en la superficie del enzima (Hoare and Koshland Jr 1967), por lo que se puede estudiar incluso como

afecta el grado de modificación a la inmovilización y que efecto tiene sobre la actividad/estabilidad del enzima (Palomo, Fernández-Lorente et al. 2007).

Por otra parte, la modificación de los grupos amino (lisinas y amino terminal) de las enzimas con anhídrido succínico confiere a la superficie de la proteína nuevos grupos carboxilos cargados negativamente que disminuyen el punto isoeléctrico de la enzima (Klotz 1967). Al igual que en el caso de la aminación química con EDA, se puede controlar el grado de modificación de los grupos amino variando la concentración de anhídrido succínico presente en la reacción (Alcalde, Plou et al. 2001).



**Figura 1.7.-** Succinilación química de una lipasa.

Además, una valiosa ventaja que nos ofrece la modificación química es poder introducir en la estructura proteica nuevos grupos muy diferentes a los grupos que nos ofrecen las cadenas laterales de los 20 aminoácidos e incluso mucho más reactivos que estos (Davis 2003).

### 3.3.2.- Modificación genética.

Al igual que la modificación química, la modificación genética también permite la mejora de la inmovilización de proteínas mediante el enriqueciendo de su superficie en lisinas (Abian, Grazú et al. 2004, Rodrigues, Barbosa et al. 2014).

Virtualmente, la ingeniería genética ha permitido la producción de cualquier proteína por medio de sistemas de producción recombinantes (Windle, Müller et al. 2014). Esta técnica da lugar a una manera muy eficaz de obtener enzimas en mayores cantidades a través de cultivos de microorganismos modificados genéticamente. Así mismo la ingeniería de proteínas ha permitido obtener enzimas con funciones renovadas y mejoradas, o incluso con funciones nuevas. Esta técnica se encarga de diseñar y/o manipular la secuencia primaria de diversas proteínas para adecuar y optimizar su funcionamiento a un determinado proceso industrial o de laboratorio. Además ofrece la ventaja frente a la modificación química de que una vez se haya obtenido el mutante de interés, no será necesario repetir el proceso de modificación cada vez que se necesite la proteína mientras se conserve el plásmido con las modificaciones introducidas. Como desventaja, la construcción, expresión y purificación del mutante

requiere un mayor tiempo frente a la rapidez con la que se puede realizar la modificación química (Cowan and Fernandez-Lafuente 2011). Esta disciplina consiste principalmente en dos métodos para llegar a este objetivo, el diseño racional y la evolución dirigida (Kumar and Singh 2013, Daniels, Campeotto et al. 2014).

El diseño racional consiste en utilizar la mutagénesis dirigida para modificar la secuencia genética de una proteína con el objetivo de sustituir uno o varios aminoácidos que sabemos que juegan un papel muy importante en la funcionalidad de esa proteína (Wilkinson, Fersht et al. 1983, Yuan, Kurek et al. 2005). Sin embargo, el principal factor limitante para su uso es el conocimiento previo requerido de la estructura de la enzima (Williams, Nelson et al. 2004). La mutagénesis dirigida ha sido una de las herramientas más comunes a la hora de averiguar la contribución de un determinado aminoácido en la estabilidad o actividad de una proteína (Hult and Berglund 2003, Ema, Fujii et al. 2005, Zhang, Liu et al. 2005, Reetz, Prasad et al. 2010). Se ha estudiado tanto el efecto de mutar residuos superficiales como residuos en el centro activo con el fin de caracterizar o mejorar las propiedades de la proteína (Perl, Mueller et al. 2000, Hult and Berglund 2003). Por ejemplo, se ha utilizado este método para modificar y/o potencializar propiedades tales como la especificidad, actividad y la estabilidad de determinadas enzimas (Fujii, Nakagawa et al. 2005), así como también para facilitar su proceso de purificación (Persson, Bülow et al. 1990). La mutagénesis dirigida en la superficie de las proteínas es también una herramienta muy útil para mejorar la inmovilización y las propiedades finales del biocatalizador (Abian, Grazú et al. 2004). Se pueden introducir nuevos aminoácidos que facilitan la interacción entre la enzima y el soporte; interacciones que no serían posibles con la enzima nativa ya que carece de esos residuos aminoacídicos y no sería posible lograr la inmovilización (Godoy, Rivas et al. 2011).

Otra herramienta poderosa que se ha usado en la ingeniería de proteínas es la evolución molecular dirigida o mutagénesis al azar. Consiste principalmente en generar mutaciones al azar en las enzimas de interés, para que posteriormente mediante el uso de mecanismos de selección y cribado molecular podamos encontrar aquellas enzimas mutadas que posean las características deseadas (Hermes, Blacklow et al. 1990). Para que la evolución dirigida sea efectiva, se debe contar con métodos efectivos y versátiles de selección de especímenes y cribado molecular a fin de agilizar el proceso (Chen and Arnold 1993). Este método mimetiza el proceso de evolución que se da en la naturaleza, pero en mucho menor tiempo. Mediante esta estrategia se ha logrado mejorar las funciones naturales de distintas enzimas, además de mejorar su habilidad para sobrevivir en ambientes distintos de los de su fuente

natural (Hermes, Blacklow et al. 1990, Rolli, O'Farrell et al. 1997, Jung, Honegger et al. 1999, Wong, Arnold et al. 2004, Molloy, Nikodinovic-Runic et al. 2013).

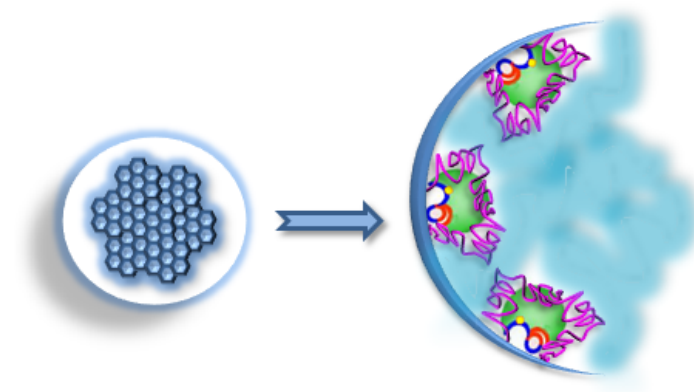
### 3.3.3.- Modificación Química y Genética.

Ambas estrategias pueden combinarse para adquirir catalizadores altamente mejorados, podemos modificar genéticamente a la enzima y posteriormente modificarla químicamente. Por ejemplo, con la mutación genética introduciendo un único residuo de cisteína en la superficie de la proteína se puede dirigir la inmovilización sobre soportes epóxido–tiol mediante la formación de un enlace disulfuro (Grazú, López-Gallego et al. 2010, Hernandez and Fernandez-Lafuente 2011). El grupo tiol es el grupo nucleófilo más reactivo en condiciones suaves de reacción y su frecuencia en la superficie proteica es baja o nula si se compara con otros nucleófilos como hidroxilo y amino (Hermanson 2013). Después podemos modificar químicamente la superficie enzimática por enriquecimiento en nucleófilos en torno a la cisteína para establecer la unión covalente multipuntual. Se lograría así la inmovilización orientada de la proteína sobre el soporte junto con la simultánea rigidificación de la estructura proteica mediante la formación de múltiples enlaces covalentes irreversibles (Grazú, Abian et al. 2005). También podríamos inmovilizar la proteína a través de otra región y luego modificarla químicamente a través de la cisteína que hemos introducido genéticamente mediante la formación de un enlace disulfuro con otro compuesto químico (López-Gallego, Abian et al. 2012).

### 3.3.4.- Modificación físico-química.

En otras ocasiones la enzima inmovilizada se puede recubrir con polímeros como la polietilenimina (PEI) o dextrano, que protegen a las enzimas del medio de reacción, traduciéndose en un aumento de la estabilidad del catalizador (Guisan, Sabuquillo et al. 2001). Una de las técnicas de estabilización de enzimas multiméricas más utilizadas es la inmovilización y posterior entrecruzamiento con polímeros (Fernández-Lafuente, Rodríguez et al. 1999). La PEI es una poliamina alifática flexible que contiene una alta densidad de grupos cargados positivamente (Bahulekar, Ayyangar et al. 1991). Se ha atribuido a la PEI un efecto estabilizador sobre la estructura terciaria de ciertas proteínas (Andersson and Hatti-Kaul 1999). Estos derivados podrían ser utilizados en reacciones donde la estabilidad frente a disolventes orgánicos es un factor limitante (Fernandez-Lafuente, Rosell et al. 1999).





**Imagen 1.8.-** Lipasas inmovilizadas y modificadas físicamente mediante el recubrimiento con polímeros para su protección frente al medio de reacción.

#### 4.- Reacciones enzimáticas para la obtención de omega-3 y derivados de interés en Tecnología de Alimentos.

Unas de las reacciones enzimáticas catalizadas por lipasas de gran interés en tecnología de los alimentos es la síntesis de TG. Como ya se ha comentado al inicio de la introducción los  $\omega$ -3 son importantes ingredientes funcionales. Éstos se pueden obtener enzimáticamente a partir del aceite de pescado.

La hidrólisis y etanolisis de aceites de pescado constituyen dos alternativas para el primer paso en la obtención de ácidos  $\omega$ -3 libres, de sus ésteres etílicos o de sus monogliceril ésteres. Los tres intermedios serían válidos para su posterior utilización en la obtención de TG, pareciendo ser esta última forma la mejor para introducirlos como ingredientes a otros alimentos y aportar sus efectos beneficiosos debido a su alta biodisponibilidad.

Existe una gran cantidad de trabajos en los que se estudian este tipo de reacciones utilizando catalizadores químicos (Hayes 2004, Crexi, Monte et al. 2012). Pero como se ha comentado anteriormente las reacciones enzimáticas presentan claras ventajas frente a la química convencional, ya que ésta emplea altas temperaturas ( $250^{\circ}\text{C}$ ) y presiones (30-50 atm) mientras que la enzimática transcurre a presión ambiental y temperaturas más suaves ( $25^{\circ}\text{C}$ - $60^{\circ}\text{C}$ ). Además no tienen lugar reacciones secundarias ni se generan productos indeseados (Haraldsson, Gudmundsson et al. 1995). Dado el carácter específico de las lipasas, los procesos enzimáticos pueden presentar la ventaja de discriminar o seleccionar entre los diferentes ácidos grasos, de forma que se puedan obtener los PUFAs de interés, y más concretamente los  $\omega$ -3 declarados como beneficiosos para la salud (Bispo, Batista et al. 2014). Por todo ello



la síntesis de estos ingredientes mediante lipasas constituye un campo de investigación cada vez más abordado (Xu 2000).

### **4.1.- Obtención de omega-3 mediante hidrólisis enzimática de aceite de pescado.**

La hidrólisis de los lípidos ocurre naturalmente en el duodeno por la acción de las lipasas digestivas. Este proceso implica principalmente la rotura del enlace éster de los TG a cargo de las lipasas, con la consiguiente acumulación de ácidos grasos libres, así como de monoglicéridos y diglicéridos o glicerol, si la hidrólisis afecta a las tres posiciones de esterificación del mismo. Numerosos artículos relatan cómo es posible obtener un buen rendimiento de hidrólisis de aceites ricos en  $\omega$ -3 en el laboratorio mediante la utilización de lipasas de forma libre (Okada and Morrissey 2007), o inmovilizadas (Pérez, Martín et al. 2011). La hidrólisis tiene lugar en una interfase lípido-agua, es decir, sólo actúan sobre sustratos insolubles. Como todas las esterasas, rompen los enlaces éster mediante la adición de agua. Puesto que, por definición, las lipasas actúan en las interfaces lípido-agua, cualquier condición que incremente la superficie de contacto sustrato-agua, incrementará la actividad de la enzima. Así, su acción es mucho más rápida en productos emulsionados. En nuestro grupo de investigación se elaboró un novedoso sistema de hidrólisis mediante un ejemplo característico de una reacción enzimática en fase heterogénea (Fernández-Lorente, Pizarro et al. 2011) que permitía aumentar dicha superficie de contacto. Normalmente se obtienen los dos  $\omega$ -3 de interés, el caso ideal sería poder obtener un método en el que la selectividad de la lipasa fuera mucho mayor hacia uno de los dos para no tener que usar posteriores técnicas de purificación.

### **4.2.- Obtención de derivados de omega-3 mediante etanolisis enzimática de aceite de pescado.**

Los ésteres etílicos de ácidos grasos se llevan utilizando años como ingredientes alimentarios (Bays, Tighe et al. 2008), por otra parte, los ésteres de etilo son buenos precursores para la producción de ésteres de triglicérido de ácidos grasos  $\omega$ -3 y estos ácidos podrían ser ingredientes ideales para alimentos ricos en  $\omega$ -3. En el año 1997 se empezó a ver que la alternativa enzimática también era una buena sustituta a la etanolisis química (Breivik, Haraldsson et al. 1997), se comenzaron a usar como sustratos AG libres y posteriormente se pasó a usar los TG directamente con el alcohol (Haraldsson, Kristinsson et al. 1997). En este tipo de reacciones es muy importante que la actividad del agua sea muy baja o nula para que no se de la reacción contraria de hidrólisis. Para ello se pueden utilizar tamices moleculares que

absorban el agua que se pueda formar y soportes en los que se inmovilice la enzima totalmente secos y de naturaleza hidrofóbica. En ocasiones al ser tan denso como es el medio de reacción puede ser aconsejable el uso de solventes orgánicos que ayuden a solubilizar los sustratos (Kahveci and Xu 2011).

### 4.3.- Síntesis enzimática de triglicéridos de omega-3.

Como se ha comentado anteriormente la obtención de TG puede ser más interesante a la hora del procesamiento digestivo ya que esta es la forma natural en la que ingerimos los lípidos (Neubronner, Schuchardt et al. 2011). Con las condiciones adecuadas las lipasas pueden dar lugar a reacciones de interesterificación, es decir, los enlaces tipo éster de los TG pueden romperse en presencia de otros compuestos (alcoholes, ácidos u otros ésteres) para formar otras estructuras denominadas “lípidos estructurados”. Gracias a este tipo de reacciones se pueden obtener TG ricos en AGPI (Mu and Porsgaard 2005). Estos TG se pueden enriquecer en un solo AGPI, varios o incluso en alguna posición específica del TG. Es muy importante tanto la composición de AGs del TG como la posición que ocupan dentro de él (Jandacek, Whiteside et al. 1987). Actualmente los de mayor interés debido a su utilización en fórmulas infantiles y en pacientes con problemas de malabsorción son los que poseen en la posición sn-1 y sn-3 AG de cadena media y en la posición sn-2 AG de cadena larga como los AGPI (Muñío, Esteban et al. 2008). La búsqueda de esta distribución se debe a que los TG de AGPI naturalmente poseen en sus tres posiciones AG de cadena larga haciendo más difícil su degradación a nivel digestivo que los TG formados por AG de cadena más corta en la posición sn-1 y sn-3 (Jandacek, Whiteside et al. 1987). Además los AG posicionados en sn-2 de los TG poseen una mejor biodisponibilidad como muestran ciertos estudios en animales (Hunter 2001), o podemos ver que es la posición natural que muestran en la naturaleza como pone de manifiesto la presencia de DHA en la posición sn-2 de la leche materna (Valenzuela, Sanhueza et al. 2006). Debido a la alta especificidad que hay que tener en este tipo de reacciones las lipasas son cruciales (Xu 2000). Pueden catalizar la incorporación de los AG de interés en posiciones específicas de la molécula de glicerina, caso contrario en la interesterificación química, donde todas las posiciones son esterificadas indistintamente (Goh, Yeong et al. 1993).

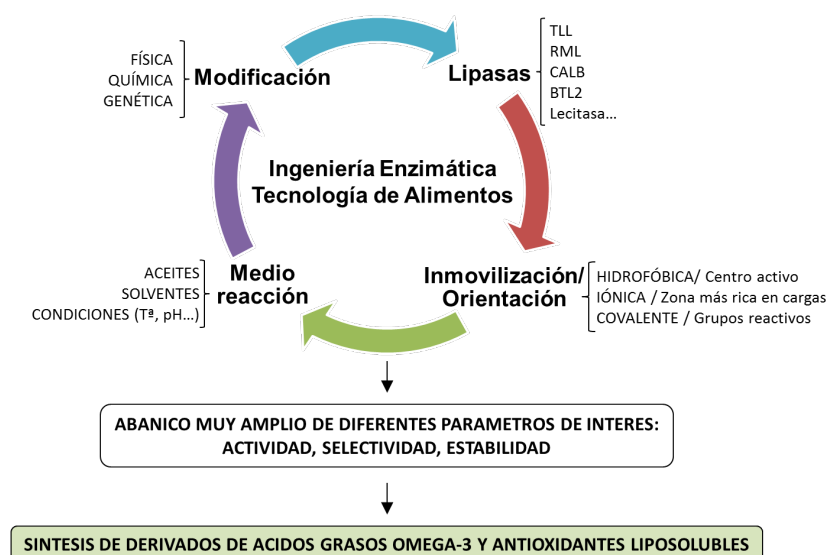
En este tipo de reacciones es muy importante que para cada catalizador de cada enzima se optimicen todas las condiciones, como la actividad de agua, el pH, la temperatura, las relaciones entre los sustratos, etc. Esta optimización habrá que realizarla teniendo en cuenta conjuntamente todos los parámetros de interés industrial: actividad, estabilidad y reusabilidad del biocatalizador, rendimientos de síntesis, etc.

## OBJETIVOS.

En esta Tesis Doctoral hemos establecido diferentes hipótesis que guiarán nuestra investigación de diferentes reacciones catalizadas por derivados inmovilizados de lipasas en medios anhidros o fase heterogénea:

- Diferentes lipasas producen diferentes formas activas con diferentes propiedades.
- Diferentes derivados de una misma lipasa con diferente orientación sobre el soporte pueden activar diferentes formas abiertas de la lipasa en presencia de un mismo disolvente o aceite.
- Un derivado de una lipasa con una orientación dada puede generar diferentes centros activos en presencia de diferentes medios anhidros: disolventes polares, apolares, aceites, etc.
- Modificación adicional de los derivados (física, química o genéticamente) puede alterar sus propiedades y mejorar su estabilidad.
- La utilización de diferentes derivados y diferentes lipasas en diferentes medios anhidros nos permitirá obtener un abanico muy amplio de posibilidades catalíticas.
- Cada reacción enzimática hay que analizarla de acuerdo con todos los parámetros de interés industrial: Actividad, Selectividad y Estabilidad.

En la figura (1) se representan esquemáticamente el conjunto de las hipótesis planteadas:



**Figura 1:** Hipótesis de trabajo de la Tesis Doctoral.

El objetivo principal de esta Tesis doctoral es el diseño de catalizadores muy eficientes de lipasas para optimizar la producción de derivados de ácidos grasos  $\omega$ -3 y la síntesis

de aditivos antioxidantes protectores de estos ácidos muy fácilmente oxidables. Cada reacción será estudiada teniendo en cuenta las hipótesis planteadas y resumidas anteriormente. Las diferentes reacciones a estudiar son:

1.- Síntesis de oleato de ascorbilo. Las principales características de este proceso son el uso de aceite de oliva como esteres activados del ácido oleico; de disolventes polares para disolver ácido ascórbico siendo estos disolventes bastante inactivantes para la mayoría de las lipasas; y medios completamente anhidros para evitar cualquier porcentaje indeseado de hidrólisis del oleato de ascorbilo.

2.- Hidrólisis de aceite de pescado. Empleamos una lipasa de estructura tridimensional conocida (BTL2) para la obtención de los ácidos grasos  $\omega$ -3 más saludables (EPA y DHA). Llevamos a cabo una serie de modificaciones físico-químicas y genéticas con la intención de modular las propiedades enzimáticas en dicha reacción.

3.- Etanolisis de aceite de pescado con disolventes polares y apolares. En este proceso estudiamos la capacidad de los diferentes derivados de las diferentes lipasas para discriminar entre las cadenas de los dos principales ácidos grasos  $\omega$ -3 (EPA y DHA). Buscábamos la liberación muy selectiva del EE-EPA para obtener el producto casi puro sin tenerlo que separar del EE-DHA.

4.- Etanolisis de aceite de pescado en ausencia de solventes. Ahora es el aceite el agente que provoca la apertura del centro activo de las lipasas. Comparamos el comportamiento de diferentes derivados de TLL y lecitasa en reacciones sin solvente con los resultados para reacciones en presencia de disolvente. De nuevo nos interesa la capacidad de liberar casi exclusivamente el EE-EPA.

5.- Síntesis de triglicéridos y sn2-monogliceridos de DHA. Estudiamos la síntesis de dichos derivados de DHA utilizando el EE-DHA como substrato activado del ácido DHA. El rendimiento de reacción era un parámetro clave. También estudiamos la regioselectividad del proceso pues nos interesaba el sn2-monoglicerido que había sido reportado como el regio-isómero más interesante en cuanto a su biodisponibilidad.

6.- Reacciones de Interesterificación de trioleína (aceite de girasol alto oleico) y diferentes derivados del ácido caprílico. El propio ácido libre, el etil ester del ácido y la tricaprilina. Buscamos la síntesis de lípidos estructurados de tipo ABA (Caprílico-Oleico-Caprílico) que tienen muy buenas propiedades como lípidos hipocalóricos.

## MATERIALES.

PROVEEDOR	PRODUCTO
<b>ENZIMAS Y DERIVADOS ENZIMÁTICOS</b>	
Fueron donados generosamente por Novo Nordisk (Dinamarca).	<i>Rhizomucor mihei</i> (RML) <i>Thermomyces lanuginose</i> (TLL) <i>Candida antarctica B</i> (CALB) Lecitasa (LC) Lipase QL from <i>Alcaligenes sp.</i> (QL) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (PFL) Novozym SP-435 (Novo 435) Derivado comercial TLL (TLL IM)
<b>SOPORTES</b>	
GE Healthcare (Uppsala, Suecia).	Octil Sepharose™ CL-4B (Hidrofóbico) BrCN Sepharose (Covalente)
Rohm and Haas (EE.UU.)	Duolite A568 (Intercambio iónico)
Bayer (Leverkusen, Alemania)	Lewatit OC1600 VP (Hidrofóbico) Lewatit CNP-105 (Covalente)
Donado por Resindion SRL.	Sepabeads-C18 (Hidrofóbico)
Agarose Bead Technologies(Madrid, España)	Agarosa 4 BCL
<b>SUSTRATOS</b>	

Sigma Chemical Co. (St. Louis, EE.UU.).	P-nitrofenil butirato (p-NPB) Aceite de oliva Ácido ascórbico
BiotecBTSA	Aceite de sardina.
<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>	
Isogen Lab Tech.	Patrón DNA, 1 kb Células supercompetentes NovoBlue Cebadores Polimerasa DpnI
Bio-Rad	Precision Plus Protein Standards 10-200kDa Kit Miniprep
Donadas por Dra. Rúa Universidad de Vigo	Células de E.coli DH5 y BL21 Plásmido pT1-BTL2
Beckton & Dickinson	Agar de patata y dextrosa Extracto de levadura Tryptona
Conda	Medio SOC
<b>PRODUCTOS QUÍMICOS</b>	

Sigma Chemical Co.  (St. Louis, EE.UU.)	Sales de tamponamiento
	Triton ® X-100 (TX)
	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)
	Tris base
	EDTA
	Etil metil cetona
	Alcohol terc-amilo
	T-butanol
	Polietilenimina (PEI) (PM 25.000)
	Hidrocloreuro de etanolamina
	1-etil-3-(dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC)
	Etanol
	Alcohol terc-amílico
	Ciclohexano
	Sal de sodio de sulfato de dextrano (PM 40.000)
	Anhídrido succínico
	Borohidruro de sodio (NaBH <sub>4</sub> )
	Etilendiamina (EDA)
	Ácido iminodiacético (IDA)
	Ampicilina
	Tamiz molecular 3 A
	Patrones de ácidos y éster metílico de EPA y DHA
	1-Naftalenotiol 99%
	Trioleina
	Tricaprilina
	Acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB)
	4-Metil umberiferil butirato (MUF)
	Ácido 3- (ciclohexilamino) -1-propanosulfónico (CAPS)
	DL-ditiotreitol (DTT)
	2-piridil-disulfuro (2-PDS)

Toronto chemical research (TRC)	Alil metanotiosulfonato
Sharlab (Barcelona, Spain)	Acetonitrilo Metanol 2-propanol Acetona
Thermo Scientific (Rockford, IL, EEUU)	Reactivo de Bradford
Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU)	Solución 30 % acrilamida/bisacrilamida Solución de Bisacrilamida 2%
<b>EQUIPOS</b>	
RP-HPLC	Inyector Spectra Physic SP 100 Detector de UV Spectra SP Physic 8450 Columna de fase inversa (Ultrabase-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm)
Balanza	Sartorius Basic
Sonicador	Selecta
Centrífugas	Beckman Allegra X-12 Centrifuge
pHmetro	Hamilton. Slimtrode. Electrodo de pH
Baños	Grant JV Nova
Rodillos agitadores	Stuart Roller mixer



Imagen geles	Bio-rad
Termociclador	Bio-rad
Campana flujo laminar	Romero
Shaker	Unitron HT Infors
Espectrofotómetro	Jasco V-630

Otros reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico o para el HPLC.

## MÉTODOS.

### 1.- Análisis de proteínas.

#### 1.1.- Cálculo de la concentración proteica.

Para llevar a cabo la determinación de proteínas se empleó el método de Bradford (Bradford 1976). Se preparó una curva de calibración a partir de soluciones a diferentes concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA). Para realizar las mediciones se tomó un volumen de 0.8 mL del buffer y se añadieron 0.2 mL del reactivo Bio-Rad para completar un volumen total de 1mL. Se mezcló bien y se dejó reaccionar por 10 minutos para posteriormente leer la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 595 nm. Una vez determinadas las absorbancias de las muestras, se aplicaron los datos obtenidos en la curva de calibración para mostrar los resultados en unidades de masa.

#### 1.2.- Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

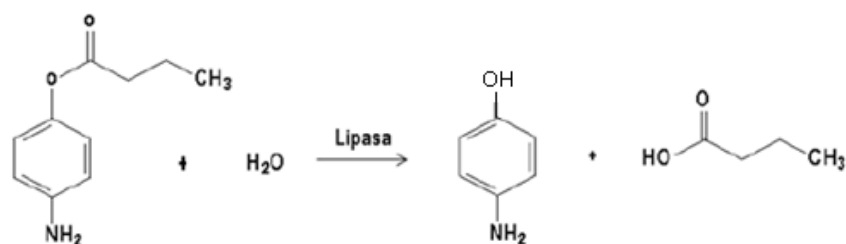
La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli en 1970 (Laemmli 1970) utilizando geles de poliacrilamida del 12%. Las preparaciones proteicas, tanto en su forma soluble como en su forma inmovilizada (el protocolo se detalla más adelante), fueron hervidas a 100°C durante cinco minutos en tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, 2% de sodio-dodecil sulfato (SDS), 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol, 10% de glicerol y 0.005% de azul de bromofenol). En la forma soluble se toman 200ul y en la inmovilizada 70mg de derivado junto con 200ul del tampón de ruptura. Una vez hervidas las muestras se toma sólo el sobrenadante, el cual se aplica al gel y se somete a una potencia de 150v. Para la visualización de las bandas según su peso molecular se tiñen los geles con azul brillante de Coomassie (Neuhoff, Arold et al. 1988).

### 2.- Determinación de la actividad de diferentes lipasas inmovilizadas y solubles.

#### 2.1.- Cuantitativa. Hidrólisis de p-nitrofenol butirato (PNPB).

Para seguir el proceso de inmovilización, las actividades de las lipasas solubles y sus preparaciones inmovilizadas se analizaron en un espectrofotómetro con un elemento termostático y con agitación magnética continua midiendo el incremento de

absorbancia a 348 nm ( $\epsilon = 5,150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) producido por la liberación de p-nitrofenol (PNP) por hidrólisis de 0.4 mM p-nitrofenil butirato (PNPB) en 25 mM de tampón de fosfato sódico a pH7 y 25 °C. Para iniciar la reacción, diferentes cantidades de solución de lipasa (blanco, sobrenadante o suspensión) se añadió a 2.5 ml de solución de sustrato. La actividad enzimática se calculó como  $\mu\text{mols}$  de PNPB hidrolizado por minuto por mg de enzima (IU) en las condiciones descritas anteriormente.



**Figura 1:** Hidrólisis del PNPB a PNP por actuación de una lipasa.

## 2.2.- Cualitativa. Para los mutantes de *Bacillus thermocatenulatus* 2.

Usamos dos métodos de detección cualitativa en placa diferentes ya que no existía experiencia previa en nuestro laboratorio. Comparamos los resultados obtenidos por ambos métodos y con el cuantitativo del que estábamos seguros para ver si podíamos usar alguno de ellos para nuestro cribado en placa.

### 2.2.1.-Hidrólisis tributirina.

Llevamos a cabo la detección cualitativa de la actividad directamente en las colonias de *E.coli* productoras de nuestra lipasa. Sembramos nuestros clones en placas de cultivo con medio de cultivo Luria–Bertani (LB) que contenía un 0.1% de tributirina que sirvió de sustrato y ampicilina a una concentración de 0.1mg/ml para seleccionar aquellas bacterias transformadas con nuestro plásmido. Se dejaron durante toda la noche a 37°C y después se midió el halo generado. El Medio LB se preparó con 0.5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (peso/volumen) (p/v) triptona, 1% (p/v) cloruro sódico y 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada, para preparar las placas se añadió agar a una concentración final de 1.5% (p/v). Posteriormente seleccionamos aquellos clones que formaban un mayor halo y se corroboró su actividad mediante el ensayo de actividad por PNPB.

### 2.2.2.- Hidrólisis 4-Metil umberiferil butirato (MUF).

Llevamos a cabo la detección cualitativa de la actividad directamente en las colonias de *E.coli* productoras de nuestra lipasa (Díaz, Prim et al. 1999). Para ello sembramos los diferentes mutantes obtenidos en placas multipocillos de 3ml de capacidad. Pusimos 2.5ml de medio LB, ampicilina 0.1mM y una punta de inóculo; dejamos crecer a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a 600nm y dejamos toda la noche a 42°C para que se expresara nuestra proteína. Una vez expresada, gracias a un replicador autoclavado, pasamos todos nuestros clones a otra placa multipocillo. En esta última placa teníamos 200ul de tampón fosfato 25mM pH 7 y 20ul de MUF (2,5mM en metanol). Esperamos durante diez minutos y posteriormente se vio la fluorescencia emitida por los diferentes pocillos. Pusimos varios pocillos control negativos (tampón+MUF, tampón+MUF+LB, tampón+MUF+LB+*E.coli*) y positivos (tampón+MUF+lipasa soluble, tampón+MUF+*E.coli* que expresaba BTL nativa). Posteriormente seleccionamos aquellos clones que emitían mayor fluorescencia y se corroboró su actividad mediante el ensayo de actividad por PNPB.

## 3.- Inmovilización de lipasas.

### 3.1.- Inmovilización hidrofóbica. Sobre Octil-Sepharosa, Lewatit OC1600 y Sepabeads C18.

Las lipasas fueron inmovilizadas sobre el soporte por activación interfacial a una fuerza iónica baja (5mM) en tampón de fosfato de sodio a 25 °C y pH7. Periódicamente, la actividad de la suspensión y el sobrenadante se analizaron mediante el ensayo de PNPB, como se describió anteriormente. En todos los casos, la carga enzimática de las preparaciones inmovilizadas fue aproximadamente de 20 mg/g de soporte, con rendimientos de inmovilización superiores al 95%, en comparación con la actividad enzimática inicial (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).

Esta inmovilización también se usa como protocolo de purificación anterior a la unión en soportes con otras estrategias de inmovilización (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).

### 3.2.- Inmovilización iónica. Sobre Duolite A568.

La inmovilización por intercambio iónico se da por adsorción de grupos químicos cargados de la superficie enzimática, a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. El soporte puede estar cargado positiva o negativamente, el soporte Duolite

es anhidro y tiene en su superficie cargas positivas (sulfonatos) que se unen a los grupos negativos de la superficie enzimática (Pereira, Facchini et al. 2015).

Previamente a esta inmovilización se inmoviliza a la enzima por adsorción hidrofóbica a Octil-Sepharosa como protocolo de purificación de lipasas. Posteriormente se desorben del soporte mediante una concentración de alrededor de 1% de detergente y ya se ofrecen diluidas al nuevo soporte (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).

A 10 ml de lipasa purificada, se añaden 90 ml de tampón fosfato 10 mM para diluir la concentración de detergente por 10 veces. El pH de la solución se ajustó a 7, y 1 g de soporte fue añadido. La mezcla de inmovilización se mantuvo a pH 7 durante 3 horas a 25 °C. Periódicamente, la actividad de la suspensión y el sobrenadante se midió por el ensayo de PNPB. En todos los casos, el rendimiento fue mayor que 95%, en comparación con la actividad enzimática inicial.

### **3.3.- Inmovilización covalente.**

#### **3.3.1.- Multipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos glioxil.**

El soporte se preparó tal como está descrito (Guisán 1988) introduciéndose en el soporte grupos glioxil en su superficie que pudieran dar lugar a la formación de enlaces con los grupos amino de la enzima. El derivado se preparó incubando 2 g de soporte agarosa-glioxil en una suspensión enzimática de bicarbonato de sodio 100 mM a pH10 y 4°C bajo agitación suave, durante un tiempo variable hasta la inmovilización de la lipasa. Los derivados se redujeron con borohidruro de sodio a 1 mg/mL en una suspensión 1:10 soporte/volumen total durante 30 min a 25°C (Mateo, Palomo et al. 2006). Finalmente el derivado se filtró y se lavó con agua destilada y fosfato de sodio 10 mM a pH7.

#### **3.3.2.- Multipuntual sobre Lewatit CNP-105 activados con grupos aldehído.**

Lewattit CNP-105 fue modificado para obtener grupos aldehído en su superficie utilizando el mismo protocolo q para el soporte glioxil-agarosa, lo que permitió que las lipasas fueran inmovilizadas por unión covalente.

Siguiendo protocolos descritos en nuestro grupo de trabajo, se comprobó que como las lipasas tienen pocos residuos lisinas en su superficie, una forma de aumentar el

número de uniones entre los grupos aminos de la enzima y los aldehído del soporte para conseguir una unión covalente multipuntual, es mediante una estrategia de aminación en fase sólida (Hoare and Koshland Jr 1967) para introducir grupos amino por modificación química de la superficie enzimática. Dicha estrategia consiste en aminor las lipasas adsorbidas sobre octil-Sepharosa tal y como se describe en el punto 5.1 de materiales y métodos.

Las lipasas aminadas se desorbieron con detergentes del octil-Sepharose como se describe más adelante, y el pH se ajustó a 9 con bicarbonato de sodio 1 M hasta una concentración final de 100 mM. Los derivados se prepararon usando 1 g de Lewattit CNP-105 y 10 ml de lipasa purificada y aminada. La mezcla de inmovilización se mantuvo a pH 9 durante 3 horas a 25°C. Para aumentar las uniones, la mezcla de inmovilización después se incubó a pH 10 durante 4 horas a 25°C. Finalmente se redujo añadiendo borohidruro de sodio sólido a una concentración de 1 mg/ml y la mezcla se incubó a 25°C con agitación suave. Después de 30 min, los derivados inmovilizados y reducidos se lavaron a fondo con agua destilada (Cabrera and Palomo 2011).

### **3.3.3.- Unipuntual sobre soportes agarosa activados con grupos bromuro de cianógeno (CNBr-Sepharosa).**

La inmovilización se llevó a cabo en condiciones suaves para tener una preparación enzimática con propiedades similares a la enzima nativa, pero donde las interacciones intermoleculares no son posibles, por lo que la interacción entre la enzima y el soporte procede a través del grupo amino más reactivo de la proteína (posiblemente el amino terminal) (Mateo, Abian et al. 2005). Como protocolo general 2 g de soporte comercial previamente suspendido en agua destilada a pH 2-3 durante unos 30 minutos (para hidratar el soporte y conservar los grupos reactivos del soporte ya que se inactivan a pH alcalino), se incubaron en un determinado volumen de una suspensión enzimática en fosfato de sodio 5 mM a pH 7 y 4°C, dejándolo en agitación suave durante poco tiempo (unos 20 min) para evitar una interacción intensa de la enzima con el soporte, buscando una unión por pocos puntos con el objetivo de que el catalizador mantenga unas propiedades similares a la enzima soluble. Una vez inmovilizada la enzima el derivado se filtró a vacío y se lavó con tampón fosfato de sodio 5 mM a pH 7 y se incubó en una disolución en relación 1/10 soporte/disolución de etanolamina 1 M a pH 8 durante 90 minutos para bloquear los grupos BrCN remanentes. Finalmente se lavó el derivado con abundante agua destilada (Mateo, Abian et al. 2005).

## 4.- Desorción de las lipasas de soportes hidrofóbicos.

Para desorber las lipasas de soportes hidrofóbicos (como octil-agarosa), 10 g del derivado, preparado como se ha descrito anteriormente, se suspendió en 100 ml de un 1% (v/v) de detergente (Triton X-100, lauril sucrosa o CTAB) en tampón de fosfato sódico 10mM a pH 7. La lauril sucrosa se utilizó para desorber los derivados TLL ya que el Triton causa una inactivación fuerte de la enzima. La desorción en presencia de detergente se lleva a cabo a 25°C. Después de 30 minutos, más del 90% de la actividad inicial se desorbe de los derivados de octil de agarosa de todas las lipasas (Fernandez-Lafuente, Armisen et al. 1998).

## 5.- Modificaciones físico-químicas de enzimas inmovilizadas.

### 5.1.- Aminación.

La aminación química se realizó tal como está descrita anteriormente en otros artículos (Palomo, Fernández-Lorente et al. 2007). A un gramo de lipasa inmovilizada sobre octil-Sepharosa se le añadió 10 ml de etilendiamina 1 M (EDA), pH 4,75, con agitación continua. 1-etil-3-(dimetilaminopropil) Carbodiimida (EDC) sólido se añadió a la suspensión para dar una concentración final de 10 mM. Después de 90 min de incubación a 25°C con agitación suave, las preparaciones inmovilizadas se filtraron al vacío utilizando una placa filtrante porosa y se incubaron durante 4h en 0.1 M de hidroxilamina, pH 7 y 4°C para recuperar las tirosinas que pudieran haber sido modificadas por EDAC (Carraway and Koshland Jr 1968). Las preparaciones se filtraron y lavaron con tampón fosfato de sodio 25 mM, pH 7, y luego con un exceso de agua destilada.

### 5.2.-Adsorción de polímeros.

Derivados inmovilizados se incubaron en 1% de polímero (polietilenimina o la sal de sulfato de dextrano sódico) en tampón de fosfato 25 mM, pH 8. La suspensión se agitó suavemente durante 1.5 h y después se lavó con tampón fosfato 5 mM. Los derivados se filtraron a vacío y se guardaron a 4°C (Guisan, Sabuquillo et al. 2001, Abian, Wilson et al. 2002).

### **5.3.- Succinilación.**

A un gramo de derivado se le añadió 10 ml de tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 8. A continuación, 0,1 g de anhídrido succínico sólido se añadió a la suspensión, bajo agitación a 25°C (la concentración final fue de 100 mM). El pH se mantuvo a 8. La mezcla se dejó reaccionar durante dos horas. Después de eso, el derivado succinilado se filtró y se lavó con un exceso de agua destilada (Cabrera, Fernandez-Lorente et al. 2009).

## **6.- Secado de los derivados enzimáticos de lipasas para su uso en medio anhidros.**

Disolventes orgánicos polares, como puede ser la acetona, se secaron por incubación durante la noche en presencia de un gran exceso de tamices moleculares secos (500 g de tamices por litro de disolvente). Luego, 5 g de derivado de lipasa se suspendió en 50 ml varias veces, se fue reduciendo el porcentaje de agua a la vez que se aumentaba el de disolvente hasta que finalmente lo dejamos sólo con disolvente y filtramos a vacío hasta secar por completo. De esta manera, el agua que llena los poros de los derivados se disolvió y diluyó en el disolvente orgánico.

## **7.- Estabilidad térmica, frente a solventes o pH de las lipasas inmovilizadas.**

La actividad de las enzimas inmovilizadas se ensayó a diferentes temperaturas en 25 mM del tampón correspondiente a diferentes valores de pH, temperaturas o porcentajes de solventes. Los sistemas de tampón utilizados fueron: acetato sódico (pH 5), citrato sódico (pH 6), fosfato sódico (pH 7 y 8) y bicarbonato sódico (pH 9 y 10). La inactivación de los derivados se midió estudiando la variación de actividad a lo largo del tiempo, utilizando como sustrato PNPB.

## **8.-Reacciones enzimáticas catalizadas por lipasas inmovilizadas.**

### **8.1.- Síntesis enzimática de Oleato de Ascorbilo catalizada por lipasas inmovilizadas.**

En primer lugar, 0.2 g de lipasa inmovilizada se añadió a la solución de sustrato, que contiene 1 mol de ácido ascórbico y 2 mol de aceite de oliva y se disolvió en 1.42 ml



de disolvente orgánico (alcohol t-amílico o t-butanol). La reacción se llevó a cabo en medios anhidros, para ello se utiliza un catalizador libre de agua (secado previamente) y se añade al medio de reacción 100mg de tamiz molecular seco. La concentración de ácido ascórbico fue de 352 mM. La reacción se siguió por HPLC. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y el error estándar nunca fue más de 5% (Moreno-Perez, Filice et al. 2013).

### 8.1.1.- Análisis por HPLC.

Reactivos y productos se analizaron mediante RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector de UV Spectra SP Physic 8450) usando una columna de fase reversa (Ultrapase-C18, 250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Los productos se eluyeron a una velocidad de flujo de 1,0 ml / min utilizando como fase móvil metanol / agua/CH<sub>3</sub>COOH (95:5:0,1). La detección UV se realizó a 254 nm. Los picos cromatográficos fueron directamente proporcionales a la concentración de ácido ascórbico a 254 nm. El oleato de ascorbilo absorbe a la misma longitud de onda que el ácido ascórbico, 254 nm, y las áreas son constantes durante todo el curso de la reacción. El tiempo de retención (RT) para el ácido ascórbico fue de 2.4 minutos y para el oleato de ascorbilo de 9 minutos. En esta longitud de onda, el aceite, los ácidos grasos y el glicerol no absorben. Las velocidades de reacción y los rendimientos sintéticos se calculan a partir de las áreas de los picos cromatográficos, correspondientes a ácido ascórbico y oleato de ascorbilo (Moreno-Perez, Filice et al. 2013).

### 8.2.-Hidrólisis enzimática de aceite de sardina catalizada por lipasas inmovilizadas.

La hidrólisis se llevó a cabo en un sistema bifásico agua/solvente. Bajo las condiciones estándar (Fernández-Lorente, Pizarro et al. 2011) se colocaron en un reactor 5ml de ciclohexano, 5ml de tampón Tris-Cl 0.1M pH6 y 0.5ml de aceite de sardina bajo una agitación de 150rpm y a una temperatura de 25°C durante 30 minutos para mezclar bien los sustratos en el medio de reacción. Después comenzó la reacción añadiendo diferentes cantidades de los derivados de las lipasas y se mantuvo mediante agitación magnética bajo las condiciones anteriores en el tiempo. La concentración de ácidos grasos fue determinada a diferentes tiempos mediante HPLC. Posteriormente se analizaron los efectos de diferentes variables como pH, temperatura y presencia de cosolventes en la reacción.

### 8.2.1.- Análisis por HPLC.

A diferentes tiempos alícuotas de 0.1ml de la fase orgánica fueron disueltas en 0.4ml de acetonitrilo. La fase orgánica se separa fácilmente de la acuosa cuando se detiene la agitación magnética. Los AG producidos fueron analizados por RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector de UV Spectra Physic SP 8450) usando una columna de fase reversa (Kromasil C8 15x0.4 cm). Los productos se eluyeron a una velocidad de flujo de 1 ml/min con acetonitrilo/agua (70:30, en volumen), pH3 (Fernández-Lorente, Pizarro et al. 2011). La detección UV se realizó a 215 nm. Los tiempos de retención de los AG fueron de 9.4 minutos para EPA y 13.5 minutos para DHA. Los tiempos y concentraciones de los productos obtenidos fueron comparados con los patrones comerciales.

### 8.2.2.- Cálculo de la actividad y selectividad EPA/DHA.

La actividad inicial se calculó como nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión de producto. La selectividad se calculó como el cociente entre la concentración de EPA generada respecto a la de DHA, cuando se ha formado alrededor de un 10% de ácidos grasos poliinsaturados totales.

## 8.3.- Síntesis enzimática de ésteres de etilo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) catalizada por lipasas inmovilizadas.

### 8.3.1.- En presencia de solvente.

Diferentes cantidades de lipasa inmovilizada seca se añadieron a la solución de reacción, que contiene 0.623 mmol de aceite de sardina y 6.2 mmol de etanol disueltos en 4.11 ml de disolvente orgánico (alcohol terc-amílico o ciclohexano). Para obtener los valores de actividad en ausencia de agua, 100 mg de tamices moleculares secos se añadieron también a la mezcla de reacción antes de la adición del derivado. La concentración de aceite de sardina fue de 125 mM. La reacción se siguió por HPLC. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y el error estándar nunca fue más de 5% (Moreno-Pérez, Guisan et al. 2014).

### 8.3.2.- En ausencia de solvente.

Diferentes cantidades de lipasa inmovilizada seca se añadieron a la solución de reacción, que contiene 1.87 mmol de aceite de sardina y 15.4 mmol de etanol. Para obtener los valores de actividad en ausencia de agua, 100 mg de tamices moleculares secos se añadieron también a la mezcla de reacción antes de la adición del derivado.

La concentración de aceite de sardina fue de 701 mM. La reacción se siguió por HPLC. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, y el error estándar nunca fue más de 5%.

### 8.3.3.- Análisis por HPLC.

Los productos se analizaron mediante RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector de UV Spectra SP Physic 8450) usando una columna de fase reversa (Ultrabase-C8, 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). Los productos se eluyeron a una velocidad de flujo de 1,5 ml / min con acetonitrilo/agua/CH<sub>3</sub>COOH (80:20:0,1, en vol.) y pH3. La detección UV se realizó a 215 nm, a la cual los rendimientos sintéticos se calcularon a partir de las áreas de los patrones correspondientes a ácido eicosapentaenoico (EPA) etil éster (tiempo de retención (RT) de 9 minutos) y el ácido docosahexaenoico (DHA) etil éster (RT de 12 minutos) (Moreno-Pérez, Guisan et al. 2014).

### 8.3.4.- Cálculo de la actividad y selectividad EE-EPA/EE-DHA.

La actividad inicial se expresa como  $\mu$ moles de etil esteres de PUFA (EEEEPA+EEDHA) sintetizados por minuto y por mg de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de esteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE), y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA, cuando se ha formado alrededor de un 10% de ácidos grasos poliinsaturados totales.

## 8.4.- Síntesis enzimática de triglicéridos de PUFAs catalizada por lipasas inmovilizadas. Interesterificación de glicerol con EEDHA.

La reacción se llevó a cabo utilizando un exceso de EEDHA (0.017mol) y glicerol (0.00124 mol) para que se pudieran llegar a formar el máximo de TG posibles, se mantuvo en un ambiente totalmente anhidro gracias al empleo de tamiz molecular y derivados acrílicos, con agitación orbital a 200rpm, bajo una temperatura controlada (37, 50 o 60°C) y en presencia de vacío para eliminar el etanol que se fuera formando y así evitar la reacción inversa. Utilizamos 1g de derivado para un volumen de 15 ml. Estudiamos el porcentaje de formación de triglicéridos de DHA retirando a diferentes tiempos 20ul de la mezcla, se diluyeron en 1ml de hexano y se analizó mediante cromatografía de gases (Moreno-Perez, Luna et al. 2015).

#### 8.4.1.- Cromatografía de gases. HPLC-ELSD.

Se utilizó un HPLC-ELSD Agilent 1260 Infinity HPLC equipado con el detector Agilent 385 ELSD (Palo Alto, CA, USA). La separación cromatográfica de los TG y otro lípidos no polares se llevaron a cabo en una columna de silica ACE a 30°C (25 x 4.6 mm, 0.5  $\mu$ m) y un gradiente ternario con diferentes flujos: 0–2 min, 99.5% A y 0.5% B; t = 4 min, 87% A y 13% B; t = 4.01 min, 87% A y 13% B; t = 9.5 min, 70% A y 30% B; t = 10 min, 70% A y 30% B; t = 14 min, 70% A y 30% B; t = 15 min, 67% A, 23% B y 10% C; t = 17 min, 67% A, 23% B y 10% C; t = 18 min, 99.5% A y 0.5% B; and at t = 20 min, 99.5% A and 0.5% B. El efluente A es isooctano, B metil t-butil eter, y el efluente C 2-propanol. El flujo fue variable (0.4 o 2.0 ml/ min). La señal y resolución óptima se obtuvo para las siguientes condiciones: temperatura del evaporador 30°C, temperatura del nebulizador 30°C, gas nitrógeno a 1.6 SLM.

#### 8.5.- Interesterificación de trioleína con ácido caprílico, ester metílico del ácido caprílico o tricaprilina.

La interesterificación se llevó a cabo en viales de vidrio de 25ml de capacidad, conteniendo siempre trioleína más el derivado del caprílico escogido en cada caso para el ensayo (ácido, metil éster o triglicérido) a diferentes relaciones molares (de 1:1 a 1:10). Una vez extraído el tiempo 0 se añadía 1g del derivado seco. La reacción transcurría en agitación orbital a 800rpm durante 24 y a temperatura constante (de 40°C a 60°C, según las condiciones estudiadas). A diferentes tiempos una pequeña cantidad era filtrada y guardada a 4°C para su posterior análisis.

##### 8.5.1.- Cromatografía de gases. HPLC-ELSD.

Para la separación cromatográfica de los triglicéridos y otros lípidos no polares se utilizó el equipo y protocolo descrito ya en el punto 8.4.1 de métodos.

#### 8.6.- Estabilidad de los derivados acrílicos en las diferentes reacciones.

En todas las reacciones estudiadas en la Tesis en medios anhidros la estabilidad térmica se evaluó siguiendo la siguiente metodología. Para ver la estabilidad de los derivados se incubaban durante diferentes tiempos y temperaturas en el medio de reacción, ya sea solvente o sólo aceite cuando corresponda. Posteriormente se añadían los o el sustrato en el caso en el que sólo había aceite y se veía su actividad en la reacción analizada anteriormente. Se comparaba la formación de producto entre

el derivado normal y el que había pasado un tiempo en incubación anteriormente. Esta comparación se llevaba a cabo gracias al análisis de los picos de los productos en el HPLC o HPLC-ELSD según está descrito para cada una de las reacciones en el apartado de métodos (8.1.1, 8.2.1, 8.3.3, 8.4.1 y 8.5.1).

## 8.7.- Reutilización de los catalizadores. Ciclos de reacción.

Con el objetivo de comprobar si los catalizadores optimizados en esta tesis, son reutilizables en numerosos ciclos de reacción, para su posible aplicación industrial los experimentos que se realizaron fueron repetir en sucesivas ocasiones, entre 5 y 10 veces las reacciones estudiadas, recuperando el catalizador y volviéndolo a añadir a una nueva mezcla de reacción. Una vez obtenido el máximo de producto que éramos capaces de obtener con el catalizador estudiado filtrábamos, nos quedábamos sólo con el derivado y tamiz molecular, lavábamos y secábamos bien con acetona para eliminar cualquier resto que pudiera quedar tanto de sustratos como de productos. Posteriormente se vuelven a añadir los sustratos de nuevo en la misma concentración, se repite de nuevo la reacción en las mismas condiciones, y se repite de nuevo el proceso cuantas veces sea necesario.

## 9.- Clonaje y expresion en *E.coli* de la proteína BTL2.

El gen de la lipasa BTL2 (X95309.1) se encuentra inserto en el plásmido pT1 (Belev, Singh et al. 1991, Rua, Atomi et al. 1998). Dicho plásmido posee un promotor de expresión por temperatura (42°C) y resistencia a ampicilina (la concentración bajo la que se crecieron las bacterias en todos los pasos ya sea en medio líquido o sólido fue de 0.1mg/ml de ampicilina). La amplificación del gen que codifica para BTL2 lo llevamos a cabo mediante PCR con los siguientes cebadores:

BTL inicio-secuencia F  
5'- GCATCCCCACGCGCCAATG-3'  
TM 76,2°C  
MW 5722

BTL parada-secuencia R  
5'-AGGCCGCAAAC TCGCCAAC-3'  
TM 71.7°C  
MW 5755

Las condiciones de PCR (Saiki, Gelfand et al. 1988), fueron las siguientes:

Mezcla de reacción		Ciclos de Amplificación (PCR)		
Producto	Cantidad (ul)	T <sup>a</sup> (°C)	Tiempo	Ciclos
Agua autoclavada	33	95	30 sg	30 x
Tampón	10	98	30 sg	
dNTPs	4	55	1 min	
Cebadores F y R	0.5	68	8 min	
Polimerasa Phusion	1	4	∞	
Plásmido DNA	1 (5ng/ul)			

## 9.1 Transformación de células competentes con el plásmido.

Las cepas competentes de *Escherichia coli* DH5α y BL21 fueron utilizadas para la clonación y expresión de la proteína de interés. A un eppendorff que contiene 200ul de células competentes de *E.coli* se añade 1ul del plásmido original o 10ul de los replicados en el caso de nuestros mutantes. Dejamos reposar durante 20 minutos en hielo. Posteriormente damos un choque térmico durante 1 minuto a 42°C. Volvemos a colocar en hielo 2 minutos. Posteriormente añadimos 700ul de medio SOC+LB (de una mezcla de 3.5ml de LB y 350ul de SOC 10x). Dejamos en agitación durante 1 hora a 37°C. Centrifugamos a 6000rpm durante 1 minuto, descartamos el sobrenadante y sembramos el pellet en una placa de LB+Ampicilina para la selección de transformantes resistentes. Se incubó la placa durante toda la noche a 37°C (Lederberg and Cohen 1974).

Para todo este proceso hacemos controles positivos de células competentes sin transformar en placas de sólo LB y controles negativos con células competentes no transformadas en placas de LB y ampicilina.

## 9.2.- Preparación de preinóculos, concentración del plásmido y gliceroles.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 20 min. Las cepas bacterianas se conservaron en placa a 4 °C durante un máximo de un mes y durante largos períodos de tiempo a -80 °C en 20% (volumen/volumen) (v/v) de glicerol. En el momento de inocularlas, se descongelaron y se incubaron en LB + ampicilina a 30 °C con una agitación de 150 rpm. Se prepara un preinóculo, con 3.5ml de medio LB, ampicilina y una colonia de las que obtenemos en la placa después de transformar nuestras bacterias. Dejamos crecer durante toda la noche a 30°C.

A partir de dicho preinóculo podemos preparar gliceroles para conservar nuestras células de E.coli con el plásmido de la BTL2 insertado o podemos expresar nuestra proteína como se detalla en el siguiente punto (Morrison 1977).

A partir del preinóculo también podemos llevar a cabo una miniprep con un kit comercial para extraer y purificar nuestro plásmido aislado y conservarlo a -20°C.

### 9.3.- Expresión de la proteína BTL2.

Tomamos los 3.5ml del preinóculo y los vertemos en un matraz de 1L (LB y Ampicilina) y se deja en agitación de 150 rpm a 30°C hasta que alcance una densidad óptica (DO) de 0.7-0.9 a 600nm. Cuando se alcanza dicha DO se sube la temperatura a 42°C que es cuando empezará a producir la proteína nuestro plásmido y se deja en agitación a la misma velocidad durante toda la noche (Godoy, Rivas et al. 2011). Posteriormente se centrifuga nuestro cultivo a 6000 rpm para quedarnos sólo con el precipitado ya que nuestra proteína es de expresión intracelular. El precipitado de 1L de cultivo se resuspende en 80ml de tampón fosfato 25mM, 0.05M NaCl y pH 7. Después sonicamos en hielo durante 10 minutos (en intervalos de 10 segundos encendido/apagado) y una amplitud del 30%. Finalmente centrifugamos a 10000 rpm quedándonos ya con el sobrenadante donde estará la enzima y lo guardamos a 4°C.

### 9.4.- Gel de DNA.

Vemos el tamaño, cantidad y pureza del preparado obtenido o de nuestro plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa (Southern 1975). Pesamos 0.4g de agarosa, añadimos 50ml de TAE 1x (Disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA) 1x, pongo a hervir unos segundos al microondas y dejo solidificando el gel. En la banda del patrón pongo 5µl del patrón y 2µl gel red; y en las de las muestras 10µl de muestra, 2µl del tampón carga 6x y 2ul de gel red. Ponemos la fuente de alimentación a 120 Voltios hasta que corran nuestras bandas y hacemos una foto en cámara ultravioleta en la que se verán las bandas iluminadas.

### 9.5.- Purificación de BTL2.

Una vez obtenido el extracto enzimático, llevamos a cabo un protocolo de purificación de nuestra lipasa. Para ello, y siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.3.1, se llevó a cabo la inmovilización del extracto enzimático a soportes octil-agarosa por adsorción hidrofóbica. Posteriormente desorbemos de dicho soporte nuestra proteína con 0.2%

de tritón X-100 en tampón fosfato 25mM pH7. Controlamos la purificación enzimática mediante electroforesis SDS en gel de poliacrilamida.

## 9.6.- Mutación de BTL2.

Se llevaron a cabo sobre una variante de la enzima nativa que no poseía cisteínas nativas (Cys 65 y Cys 296) en su secuencia (donadas generosamente por Dra. Rúa Universidad de Vigo). Se hizo de esta forma ya que queríamos introducir genéticamente cisteínas de forma dirigida en la superficie enzimática y sobre dichas posiciones realizar modificaciones físico-químicas mediante la formación de enlaces disulfuro.

### 9.6.1.- Mutaciones dirigidas.

Llevamos a cabo mutaciones puntuales en la secuencia de BTL2 mediante PCR con la utilización de cebadores. Las condiciones de PCR fueron las mismas descritas que para la amplificación de nuestro plásmido original. Posteriormente incubamos durante 4 horas a 37°C con DpnI para eliminar aquellos plásmidos no replicados ya que restringe exclusivamente ADN metilado (Shenoy and Visweswariah 2003), después la transformación en células competentes y una miniprep para extraer nuestro plásmido mutado. La secuenciación de ADN se realizó en el servicio de Secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para comprobar si nuestra mutación se había realizado con éxito. Las mutaciones puntuales se llevaron a cabo en las posiciones 17, 245, 320 y 291. En la mayoría de los casos sustituimos el aminoácido original por una cisteína para llevar a cabo posteriormente una modificación físico-química mediante enlace disulfuro a través de dichos residuos.

### 9.6.2.- Mutaciones al azar.

Se llevaron a cabo con unos cebadores de oligonucleótidos mixtos, NDT (Reetz, Kahakeaw et al. 2008). Todo el proceso fue igual que en el caso de la mutación dirigida menos dichos cebadores. Se generaron en este caso más de una variante, hasta un número posible de doce, en la posición escogida. Las posiciones mutadas con dichos cebadores fueron 16, 165, 171, 245, 291, 320 y 360.



## 9.7.- Modificación físico-química de mutantes con grupos químicos.

En aquellos mutantes que habíamos llevado a cabo una tiolación por mutagénesis dirigida, es decir, introducción de un residuo de cisteína en distintas zonas de la superficie de la enzima llevamos a cabo su modificación físico-química con los grupos Naftaleno-tiol y Alil metanotiosulfonato). Esta modificación se llevó a cabo en todos los casos sobre la enzima ya inmovilizada.

### 9.7.1.- Introducción de puentes disulfuros y modificación con grupos químicos (Naftotiol y Alil metanotiosulfonato).

En la modificación química selectiva de la cisteína en una proteína mediante intercambio disulfuro generalmente se utilizan reactivos activados con 5,5'-ditiobis 2 ácido nitrobenzoico (DTNB), 2-dipirinil sulfuro (2-DPS) o metanotiosulfonatos (MTS), que actúan como activantes y protectores permitiendo el intercambio disulfuro, ya que termodinámicamente se favorece la formación del disulfuro en la proteína (DeSantis and Jones 1999, Chalker, Bernardes et al. 2009). En el caso en que queramos modificar nuestra proteína con naftaleno-tiol utilizaremos DTNB o 2-PDS indistintamente como reactivo activado, mientras que para la modificación con alil metanotiosulfonato él mismo actuará como tal ya que se trata de un MTS.

Una vez inmovilizada la enzima nuestro primer objetivo es reducir la cisteína introducida para que pueda formar el enlace disulfuro cuando se incorpore el reactivo activado, para ello ponemos el derivado en presencia de tampón fosfato 25mM, 0.02% de detergente tritón (Tx-100), 5mM DL-ditiotreitol (DTT) y pH 8 en relación 1/10 (derivado/tampón). Se deja agitando durante 30 minutos y se lava abundantemente con agua destilada para eliminar todo el DTT. Retiramos una pequeña cantidad de derivado como control.

Ahora añadimos en una relación 1/10 al derivado, tampón fosfato 25mM, 0.02% Tx-100, 1.5mM del agente activante (en el caso del MTS irá diluido en 50% de dimetil sulfóxido, DMSO), pH8 para formar un enlace disulfuro entre nuestra cisteína de la superficie enzimática y dicho compuesto. Dejamos 2 horas en agitación y retiramos una cantidad para el control. Medimos finalmente la absorbancia a 343nm del sobrenadante y los blancos en cubeta de cuarzo para calcular los nmol/g de grupos SH desprendidos en la reacción que serán equivalentes a los moles de cisteína activados.

Posteriormente para modificar nuestros derivados con naftaleno ofrecemos en una relación 1/10 con tampón fosfato 25mM, 0.02% tritón X-100, 60% acetonitrilo, 1.5mM del compuesto aromático modificado (naftaleno-tiol), pH8 durante 16 horas. Medimos absorbancia del sobrenadante a 343 nm en cubeta de cuarzo y lavamos.

### 9.7.2.- Desulfuración de puentes disulfuro a enlace tioeteres.

Ponemos nuestros derivados (modificados con alil metanotolsulfonato y naftaleno) en una relación 1/10 con el tampón fosfato 25mM, 0.02% tritón X-100, 70mM CAPS, 10mM Tris-dietil-aminofosfina pH 9.5 durante 18 horas. Lavamos y dializamos durante una noche a 4°C.

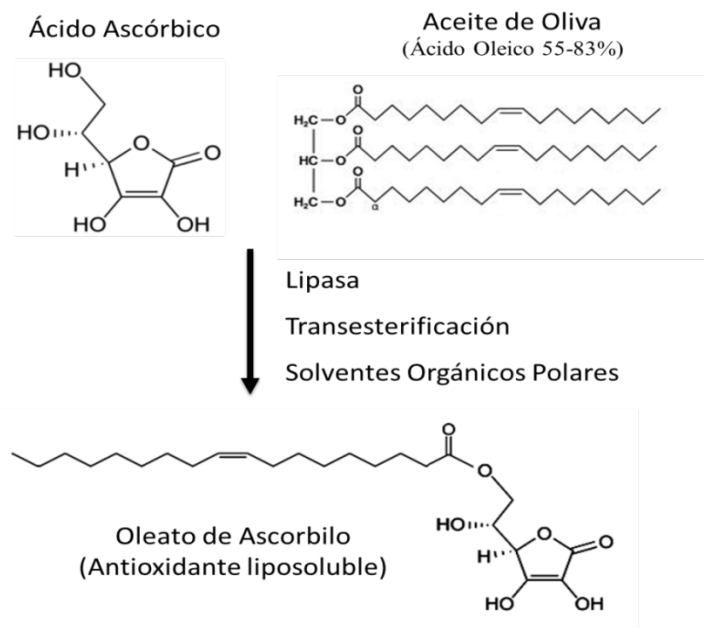
### 9.7.3.- Comprobación de la modificación con el reactivo de Ellman (DTNB) y 2-PDS.

El análisis del contenido de grupos tioles fue determinado espectrofotométricamente mediante dos métodos diferentes. Por un lado el método previamente descrito por Ellman (Ellman 1959), 0.1 g del catalizador de BTL fue incubado en 1 mL en una solución de Acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB) 1 mM en tampón fosfato 25 mM pH 8.0 a 25 °C durante 30 minutos. También lo hicimos por el método descrito por Brocklehurst y col, 1973, en el que 0.1 g del catalizador de BTL fue incubado en 1 mL en una solución saturada de 2-PDS 1.5 mM en tampón fosfato 100 mM pH 8.0 a 25 °C durante 30 minutos. Después los derivados fueron filtrados y lavados con agua. Posteriormente se cuantificó la absorbancia del sobrenadante a 405 nm para determinar los moles de 5-tiol-2-ácido nitrobenzoico ( $\epsilon=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), que se correlaciona equimolarmente con los moles cisteínas presentes en la muestra.

## RESULTADOS.

### 1.- Síntesis enzimática de Oleato de Ascorbilo.

Una de las problemáticas que se presenta a la hora de incorporar los  $\omega$ -3 como ingredientes funcionales a los alimentos, es su fácil oxidación. En esta Tesis proponemos una alternativa a este problema, que sería la síntesis directa de un antioxidante liposoluble apto para la protección frente a la oxidación de PUFA's, oleato de ascorbilo, a partir de dos compuestos naturales y mediante un método enzimático específico sin necesidad de un proceso de purificación posterior laborioso como podemos ver en la figura (5.1). La reacción en principio parece sencilla, pero presenta el inconveniente de tratarse de la condensación de dos moléculas con polaridades muy distintas, esto hace que sea imprescindible el uso de un medio de reacción que nos permita disolver los dos sustratos, es decir, disolventes polares en medios anhidros. Los disolventes más apolares (los más idóneos para la actividad y estabilidad de las lipasas) no sirven ya que no solubilizan los alcoholes polares y por otro lado los disolventes más polares se han descrito como muy negativos para la actividad y estabilidad de enzimas (Teso Vilar E. 2013). Ya se ha intentado algo similar anteriormente (Reyes-Duarte, Lopez-Cortes et al. 2011) pero con bajos rendimientos, debido a las condiciones de reacción en las que hay que trabajar. Nosotros lo que hicimos fue optimizar el proceso para aumentar el rendimiento de síntesis y velocidad de reacción. Por ello, una clave para el desarrollo de este tipo de reacciones es el diseño de estrategias de inmovilización que nos permitan aumentar significativamente la estabilidad de las enzimas en disolvente polares orgánicos (Hanefeld, Gardossi et al. 2009) aptos para el uso en alimentación como lo son la metiletilcetona o 2-butanol, como recoge el Real Decreto 1101/2011, de 22 de julio, por el que se regulan los disolventes de extracción utilizados en la elaboración de productos alimenticios y sus ingredientes. Para ello se trabajó en mejorar la estabilidad de los catalizadores en las condiciones de reacción introduciendo las mejores condiciones de reacción, lipasas, soportes y técnicas de estabilización para la reusabilidad de los catalizadores.



**Figura 1.-** Síntesis de Oleato de ascorbilo mediante una lipasa inmovilizada como catalizador y en presencia de solventes.

### 1.1.- Optimización de la Síntesis enzimática de oleato de ascorbilo catalizada por Novozym SP-435.

Lo primero que hicimos fue probar las condiciones óptimas de reacción en cuanto a medio utilizado, temperatura, contenido de agua, concentración de sustratos y posibles sustratos que podríamos usar en la reacción. Para ello utilizamos un derivado comercial (Novozyme 435), el cual tiene la lipasa CALB absorbida sobre un soporte de naturaleza hidrofóbica. El porcentaje de peso/volumen entre el catalizador y la mezcla de reacción fue de 1/40.

### 1.2.- Estudio del medio de reacción.

Como se comentó en la introducción debido a la baja miscibilidad que existe entre los sustratos que vamos a utilizar (aceite y ácido ascórbico), es necesario el uso de solventes que faciliten su mezcla. Utilizamos tres tipos de disolventes polares y anhidros para evitar la presencia de agua y que no se dé el fenómeno de hidrólisis que puede revertir la reacción. Como lo que perseguimos con el uso de disolventes es una buena miscibilidad de los sustratos pero que no dañe al catalizador, estudiamos el porcentaje de solubilidad del ácido ascórbico en cada uno de los solventes escogidos y la estabilidad del derivado en cada uno de ellos.

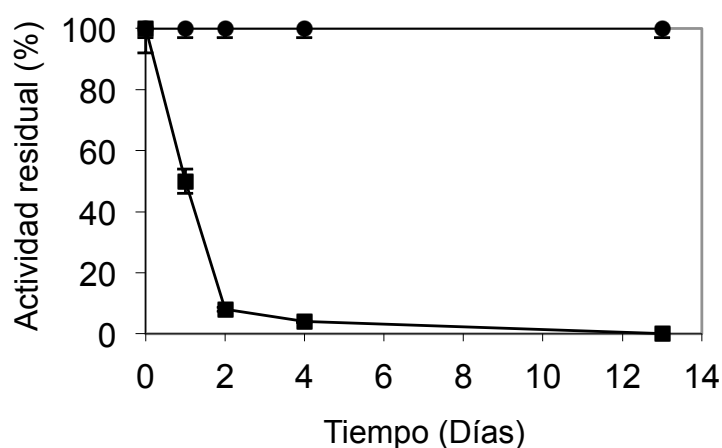
Ácido Ascórbico (mM)	Solubilidad (%)		
	Alcohol t-amílico	Metiletilcetona	T-Butanol
1	64	100	78
2	58	100	65
3	56	100	60
4	52	100	47
5	50	100	33

**Tabla 1.-** Solubilidad de Ac. Ascórbico en disolventes polares y anhidros.

La Metiletilcetona ( $\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5$ ) era el disolvente que mejor solubilizaba el ácido ascórbico, sin embargo, no se pudo utilizar debido a que el seguimiento de dicha reacción se llevó a cabo por HPLC acoplado un detector de UV, y dicho disolvente interfería en el análisis. La solubilidad en los otros solventes fue muy similar para ambos a bajas concentraciones, pero no a mayores concentraciones, donde en alcohol terc-amílico fue mucho más soluble (tabla 1).

En cuanto a la estabilidad, el catalizador aguanta mucho más en presencia de t-amil alcohol ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ) que en *t-butanol* ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) (figura 1.1). Mientras que en t-butil alcohol a los dos días ya no hay actividad remanente con el alcohol t-amílico se mantiene al 100% durante 13 días.

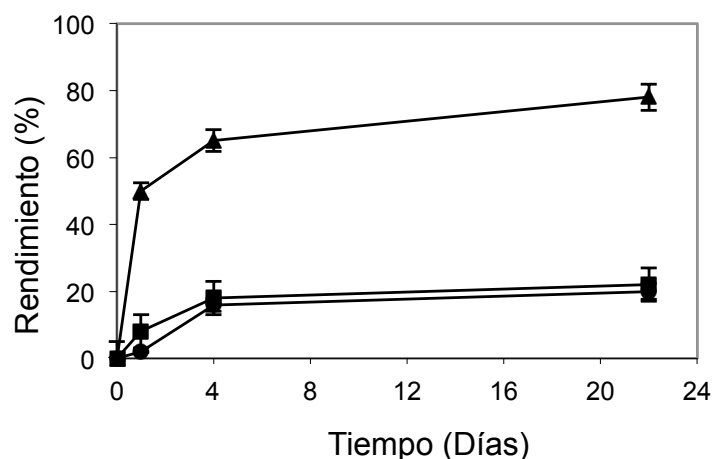
Los resultados obtenidos hasta el momento, nos permitieron fijar como disolvente para llevar a cabo la reacción el alcohol t-amílico, ya que el derivado es muy estable en este solvente y la solubilidad del ácido ascórbico es bastante buena.



**Figura 1.1.-** Estabilidad de Novozym 435 en disolventes a 45°C. Alcohol t-amílico (círculos), t-butanol (cuadrados).

### 1.3.- Temperatura óptima para la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo.

Posteriormente pasamos a estudiar que temperatura era la más adecuada para este tipo de reacción en cuanto a rendimientos y velocidad. Se llevó a cabo la síntesis del oleato de ascorbilo en alcohol t-amílico y catalizada por Novozyme 435 a tres temperaturas diferentes, 25, 37 y 45°C. La temperatura óptima de reacción se fijó a 45°C observándose una clara y satisfactoria diferencia respecto a las otras dos temperaturas (Figura 1.2). A las cuatro horas de reacción a 25 y 37°C el rendimiento de síntesis no llega al 20% mientras que a 45°C es mayor del 60%. Este aumento en el rendimiento de la reacción al aumentar la temperatura con el uso de enzimas ya ha sido descrito en otros trabajos (Daniel, Danson et al. 2008).



**Figura 1.2.-** Optimización de la temperatura de reacción. Rendimiento de síntesis de oleato de ascorbilo en alcohol t-amílico 25°C (círculos), 37°C (cuadrados) y 45°C (triángulos).

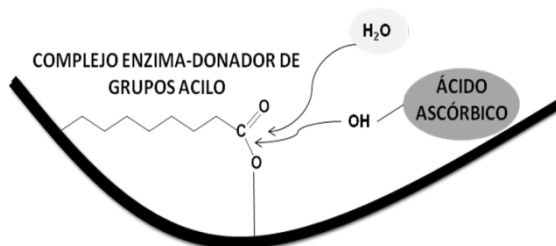
### 1.4.- Efecto del agua en la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo.

Estudiamos como afectaban diferentes concentraciones de agua a la reacción ya que la presencia de agua puede implicar la reacción inversa de hidrólisis. Por otra parte una pequeña cantidad de agua puede ser esencial para el correcto funcionamiento del biocatalizador (Bell, Halling et al. 1995, Soares, Teixeira et al. 2003). La ausencia total de agua se controló gracias a la adición de tamiz molecular, se probaron diferentes concentraciones de tamiz de modo que pudiésemos usar la mínima cantidad con el máximo efecto deseado (100 mg de tamiz para 5 ml de solvente), es decir, para obtener el mayor rendimiento posible de síntesis.

Agua (%)	Síntesis (%)
0	70
0,00010	62
0,00025	40
0,00250	14
0,02500	0

**Tabla 1.1.-** Efecto de la presencia de agua en los porcentajes de síntesis de oleato de ascorbilo con Novozyme 435 en t-amil alcohol y 45°C a las 15 horas de reacción.

Como se puede observar en la tabla 1.1 los rendimientos de síntesis son mayores cuanto menos es el porcentaje de agua en el medio. A medida que aumenta el porcentaje de agua el rendimiento va disminuyendo hasta llegar a 0 con un 0.025% de agua. Esto se podría explicar debido a que el agua puede ser un competidor del ácido ascórbico, ya que ambos pueden interaccionar con los grupos acilo de la enzima, como se puede ver en la figura 1.3.



**Figura 1.3.-** Efecto competidor del agua con el ácido ascórbico frente a los grupos acilo de la enzima inmovilizada.

### 1.5.- Estudio de la relación molar de los sustratos utilizados en la síntesis enzimática de oleato de ascorbilo.

Utilizamos una cantidad fija de ácido ascórbico (352mM) para diferentes concentraciones de aceite de oliva utilizando como medio de reacción t-amil alcohol. Se obtiene un mayor rendimiento de síntesis a medida que vamos aumentando la concentración de aceite respecto a ácido ascórbico. El mejor resultado lo obtuvimos para una relación 2:1 Aceite de oliva/Ácido ascórbico, consiguiendo un rendimiento de síntesis del 80% en 16 horas (tabla 1.2). Si aumentamos aún más la cantidad de aceite a una relación 5:1 Aceite de oliva/Ácido ascórbico no se observan diferencias significativas, llegamos al mismo rendimiento en menos tiempo, pero no compensa utilizar tanta cantidad de aceite.

Concentración Aceite Oliva (mM)	Concentración Ácido Ascórbico (mM)	Síntesis (%)	Tiempo (horas)
176	352	40	48
352	352	70	11
704	352	80	16
1760	352	81	11

**Tabla 1.2.-** Efecto de la concentración de sustratos en el porcentaje de síntesis, con Novozyme 435 en t-amil alcohol, 45°C y ausencia total de agua.

### 1.6.- Síntesis enzimática entre diferentes aceites y el ácido ascórbico para la obtención de un antioxidante liposoluble capaz de proteger a los PUFAs frente a la oxidación.

También probamos a usar aceite de palma como sustrato. Ambos poseen diferente composición, el aceite de palma posee en su composición el 50% de AG saturados (ácido palmítico y esteárico) y el 50% de insaturados (ácido oleico y linolénico) mientras que el de oliva sólo presenta un 10% de saturados frente a un 90% de insaturados (Bailey, Swern et al. 1979). El porcentaje de síntesis total es similar en ambos pero en el caso del aceite de palma se obtiene una mezcla casi equitativa de oleato y palmitato de ascorbilo mientras que en el caso del aceite de oliva se obtiene en exceso el oleato de ascorbilo (tabla 1.3). Por lo que se puede concluir que este método es apto para la síntesis de un antioxidante liposoluble con diferentes tipos de aceites como sustrato, pero el objetivo de nuestro trabajo era la obtención del oleato de ascorbilo por lo que el aceite de oliva es el mejor sustrato ya que no hace falta una separación a posteriori para purificarlo.

Ácido ascórbico (mM)	Aceite de palma (mM)	Aceite de oliva (mM)	Oleato de ascorbilo %	Palmitato de ascorbilo %
352	704	0	40	50
352	0	704	80	10

**Tabla 1.3.-** Rendimiento de síntesis de oleato y palmitato de ascorbilo con Novozyme 435 en t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite.

### 1.7.- Influencia del catalizador en la síntesis enzimática del oleato de ascorbilo.

Una vez fijadas las condiciones óptimas de reacción con el catalizador comercial Novozyme 435 se llevó a cabo un estudio para optimizar el catalizador en la síntesis del oleato de ascorbilo. Para ello inmovilizamos tres lipasas comerciales (CALB, TLL y RML) mediante tres estrategias diferentes. Teniendo en cuenta que la reacción se hace en medios anhidros para evitar la posible hidrólisis en el transcurso de la reacción, el estudio de la inmovilización lo realizamos utilizando como soportes resinas acrílicas. Dichas resinas fueron Duolite (intercambio aniónico), Lewatit 1600 (adsorción hidrofóbica) y Lewatit Glioxil 105 (unión covalente multipuntual). Para el caso del intercambio iónico la inmovilización se produce por la zona más rica de la proteína en grupos carboxilo, en la adsorción hidrofóbica por la zona más rica en residuos hidrofóbicos que suele ser el centro activo y en la unión covalente multipuntual por los grupos amino de la enzima, los cuales se han podido aumentar en número en la



superficie proteica gracias a la modificación química de los grupos carboxilo descrita en la introducción.

Lo primero que hicimos fue ofrecer la misma cantidad de proteína a cada soporte, ofrecimos 20 mg de proteína por gramo de soporte, para ver el rendimiento de inmovilización y la actividad que presentaba cada catalizador. Los porcentajes de inmovilización y actividad de los derivados se pueden ver en la tabla 1.4. En todos los casos el rendimiento de inmovilización fue superior al 60%. CALB y TLL exhibieron actividades superiores a 200 U por gramo de soporte. El catalizador con mayor actividad fue la comercial, que alcanzó las 390 U por gramo de soporte. En el caso de RML la actividad fue un poco menor, en el rango de 100U por gramo de soporte. En todos los casos la actividad recuperada después de la inmovilización fue superior al 80%.

Lipasa	Derivado	Rendimiento de inmovilización (%)	Actividad específica (UI/mg)
CALB	Duolite	70	260
	Lewatit Gx 105	65	220
TLL	Duolite	93	244
	Lewatit 1600	79	209
	Lewatit Gx 105	97	255
RML	Duolite	62	74
	Lewatit 1600	89	107
	Lewatit Gx 105	88	106

**Tabla 1.4.-** Rendimiento de inmovilización y actividad específica para los diferentes derivados preparados para llevar a cabo la síntesis del oleato de ascorbilo.

En general los rendimientos de inmovilización en este caso dependieron más de la lipasa utilizada que del tipo de soporte e inmovilización en cuestión, ya que para una misma lipasa los valores de actividad se mantuvieron en el mismo orden.

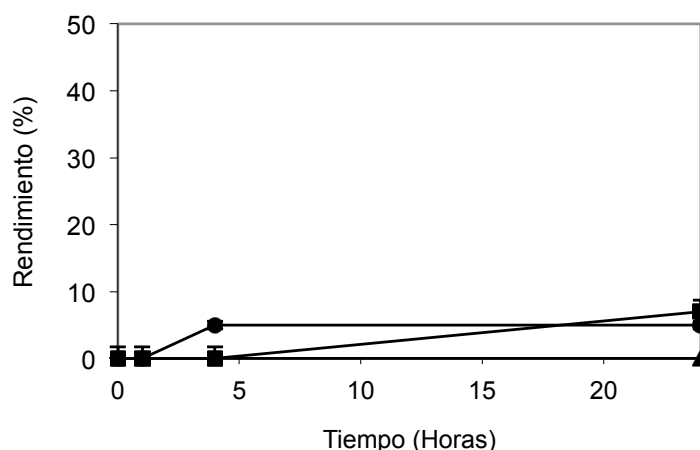
Llevamos a cabo la reacción de formación de oleato de ascorbilo, con las mejores condiciones descritas anteriormente: t-amil alcohol como solvente, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. El porcentaje de peso/volumen entre el catalizador y la mezcla de reacción fue de 1/40. Los rendimientos de síntesis fueron muy diferentes dependiendo de los catalizadores utilizados, tanto de la lipasa escogida como del soporte. Para los catalizadores con los que obtuvimos un mayor rendimiento probamos también a modificarlos posteriormente con PEI y estudiamos de nuevo el rendimiento de síntesis ya que al ser el medio de reacción un solvente orgánico éste podría afectar negativamente a la actividad y

estabilidad del catalizador y lo podríamos proteger en parte con este polímero catiónico.

## 1.8.- Influencia de la estrategia de inmovilización en la síntesis de oleato de etilo catalizada por las diferentes lipasas escogidas.

### 1.8.1.- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de RML.

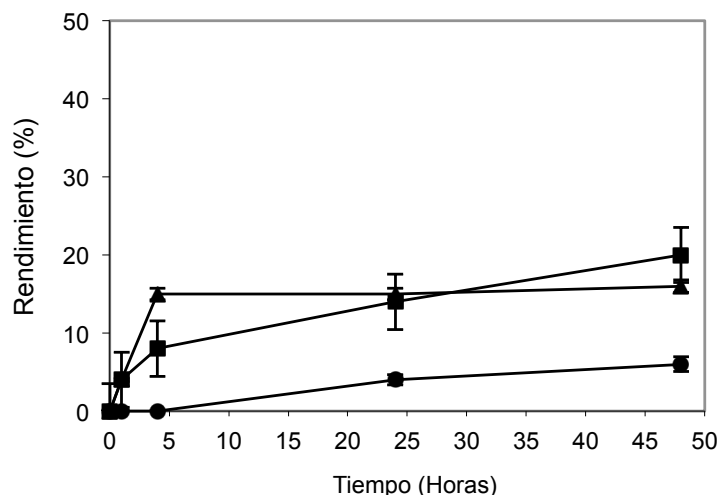
Se probaron las tres estrategias de inmovilización diferentes para RML. En los tres casos los rendimientos fueron muy bajos, ninguno de los catalizadores alcanzó un 10% de síntesis después de 24 horas de reacción (figura 1.4).



**Figura 1.4.-** Porcentaje de rendimiento de síntesis de oleato de ascorbilo con el tiempo. Condiciones de reacción t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. Lipasa RML inmovilizada en Duolite (triángulos), Lewatit 105 (círculos), Lewatit 1600 (cuadrados).

### 1.8.2.- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de TLL.

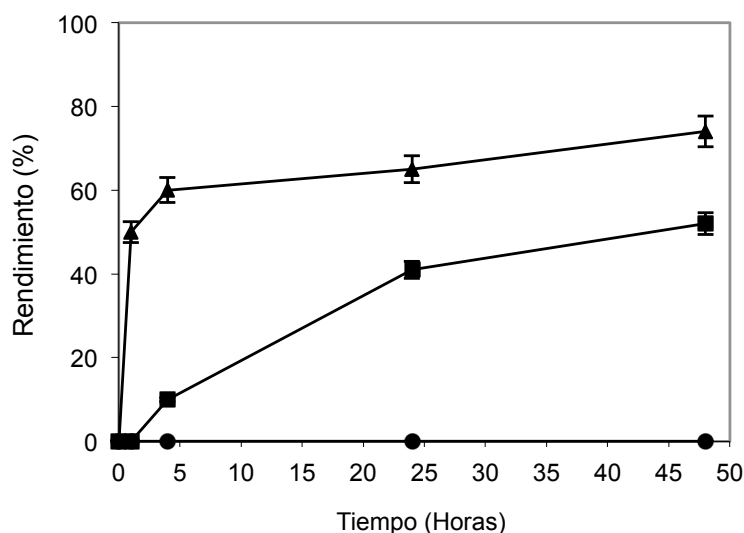
El mejor resultado en cuanto a rendimiento para las tres estrategias de inmovilización se corresponde al intercambio iónico (duolite), con el que se logra alcanzar un rendimiento del 20% en 48 horas, mientras que para la inmovilización hidrofóbica se queda estable en un rendimiento del 15% desde las 4 horas (figura 1.5).



**Figura 1.5.-** Porcentaje de rendimiento de síntesis de oleato de ascorbilo con el tiempo. Condiciones de reacción t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. Lipasa TLL inmovilizada en Lewatit 105 (círculos), Lewatit 1600 (triángulos), Duolite (cuadrados).

### 1.8.3- Síntesis de oleato de etilo catalizada por diferentes catalizadores de CALB.

Los rendimientos fueron muy diferentes dependiendo del tipo de inmovilización. Mientras que con la UCM no obtenemos síntesis de oleato de ascorbilo a las 48 horas, con la inmovilización por intercambio iónico obtenemos un 52% y con la adsorción hidrofóbica un 74% (figura 1.6). En la inmovilización de tipo hidrofóbica el centro activo de la enzima se encuentra hacia el soporte quedando protegido en parte debido al ambiente hidrofóbico creado a su alrededor traduciéndose en el mejor resultado observable. Por otro lado, en la UCM en Lewatit-Glioxil105 la enzima se orienta dejando el centro activo expuesto al medio y además la interacción entre la enzima y el soporte es muy fuerte y puede distorsionar la estructura enzimática, esto puede influir en la actividad y estabilidad de la enzima traduciéndose en un peor comportamiento. Si vemos el resultado de la inmovilización de tipo iónica es intermedio, esta inmovilización también expone el centro activo al solvente polar orgánico pero al no ser la unión rígida puede modular su comportamiento.



**Figura 1.6.-** Porcentaje de rendimiento de síntesis de oleato de ascorbilo con el tiempo. Condiciones de reacción t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. Lipasa CALB inmovilizada en Lewatit 105 (círculo), Duolite (cuadrados) y Novozyme 435 (triángulos).

Estos resultados nos muestran que la lipasa que mejor se comporta en este tipo de reacción es CALB. La UCM no es muy favorable en esta reacción debido a que el centro activo de las lipasas queda muy expuesto al medio de reacción y además la estructura enzimática se encuentra muy rigidificada.

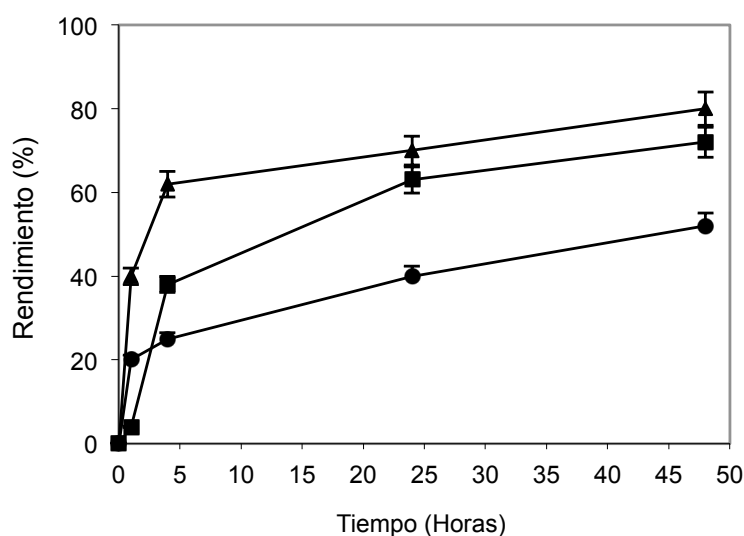
### 1.9.- Influencia de la estrategia de post-inmovilización con PEI en la síntesis de oleato de etilo catalizada por las diferentes lipasas escogidas.

Se recubrieron posteriormente con PEI la superficie de los mejores catalizadores obtenidos en cuanto a rendimiento de síntesis. Se llevó a cabo esta estrategia para ver si era capaz de aumentar dicho rendimiento al evitar el contacto directo del catalizador con el solvente empleado.

En el caso de RML no probamos a recubrir ninguno de los catalizadores con PEI ya que obteníamos unos rendimientos muy bajos. Cuando recubrimos con PEI el derivado de TLL inmovilizado mediante intercambio iónico (duolite) se logró pasar de un rendimiento de síntesis del 20% hasta un 45% a las 48 horas, es decir, mejoramos el rendimiento en más del doble. En el caso de CALB, los resultados tan satisfactorios obtenidos anteriormente, conseguimos mejorarlos aún más mediante el recubrimiento de los catalizadores con PEI. El mejor resultado lo obtuvimos con el soporte comercial Novozym 435 recubierto con PEI alcanzando un rendimiento del 85% en 48 horas. Si

vemos el resultado de la inmovilización de tipo iónica, conseguimos pasar de un rendimiento del 52% al 72% en 48 horas, casi igualando al de Novozyme 435 (74%).

Estos resultados muestran, sobre todo en la inmovilización de tipo iónica, en la que el centro activo queda expuesto al solvente polar orgánico, que es fundamental que el centro activo de la enzima quede protegido del solvente presente. En la adsorción hidrofóbica ya está en parte protegido pero lo aumentamos con el recubrimiento con PEI, y en el caso de la interacción iónica que no está protegido al recubrirlo con PEI el resultado es más impactante (figura 1.7).



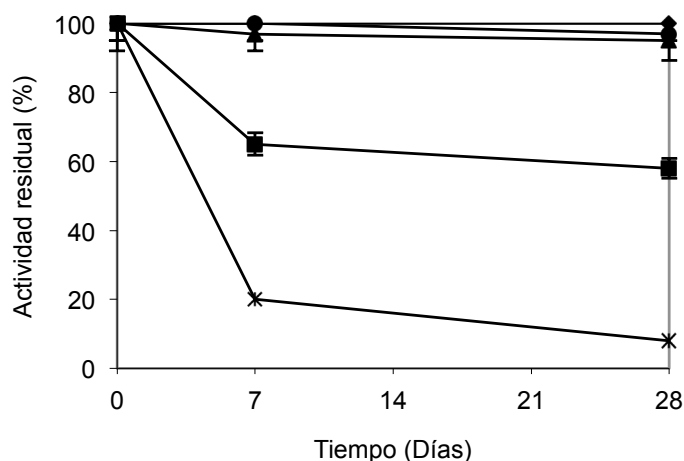
**Figura 1.7.-** Porcentaje de rendimiento de síntesis de oleato de ascorbilo con el tiempo. Condiciones de reacción t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. Lipasa TLL inmovilizada en Duolite+PEI (círculo), CALB en Duolite+PEI (cuadrados) y Novozyme 435+PEI (triángulos).

Por lo que con el recubrimiento de los catalizadores con PEI conseguimos mejorar en todos los casos el rendimiento de síntesis.

### 1.10.- Inactivación térmica de los catalizadores utilizados en la síntesis de oleato de ascorbilo.

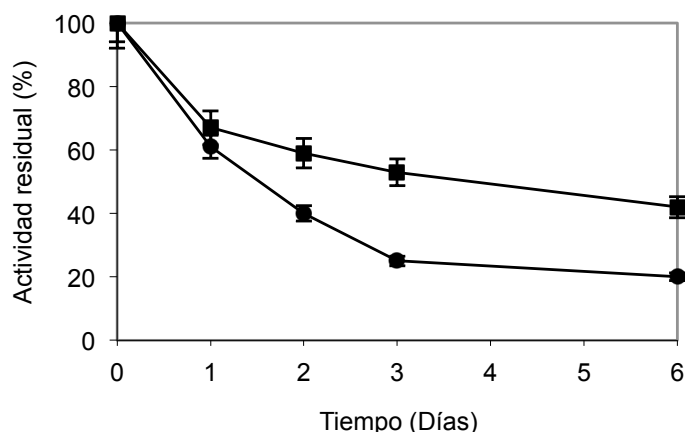
Se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de las lipasas inmovilizadas en las condiciones de síntesis, 45°C, para los mejores derivados obtenidos en cuanto a rendimiento de síntesis de las tres lipasas estudiadas. Es importante que aparte de tener un buen rendimiento de síntesis sean estables para poder reusar durante muchos ciclos los catalizadores para su posible uso biotecnológico. En todos los casos fueron más estables los catalizadores de CALB frente al que se estudió de TLL (TLL-Duolite-PEI). A los 7 días de incubación de los catalizadores en el medio de reacción,

TLL-Duolite-PEI sólo conservaba un 20% de actividad residual mientras que todos los de CALB aún conservaban más del 60%. Se obtuvieron resultados muy satisfactorios para el derivado comercial Novozym 435, Novozym 435 recubierto por PEI y CALB Duolite recubierto por PEI ya que los tres después de 28 días en presencia de disolvente aún preservaban el 100% de actividad residual.



**Figura 1.8.**-Inactivación térmica de los catalizadores utilizados en la síntesis de oleato de ascorbilo. Condiciones de reacción t-amil alcohol, 45°C, ausencia total de agua y relación molar 1:2 ácido ascórbico/aceite de oliva. Novozyme 435 (rombos), Novozym 435 PEI (círculos), CALB Duolite PEI (triángulos), CALB Duolite (cuadrados), y TLL Duolite PEI (asteriscos).

Para asegurarnos que el aumento en la estabilidad se debía al recubrimiento con PEI pasamos a estudiar los mejores derivados en cuanto a actividad y estabilidad bajo unas condiciones drásticas de reacción. Escogimos el derivado comercial Novozyme 435 y el mismo recubierto con PEI. En vez de someterlos a las condiciones óptimas de reacción variamos la temperatura hasta 75°C. Como se puede ver (figura 1.9) la estabilidad es notablemente mejor en el caso en el que el derivado se recubre con PEI, la actividad residual del derivado recubierto por PEI duplica (40%) al que no lo está (20%) a los seis días de incubación en el disolvente. Esto se puede deber a la protección que ejerce éste polímero catiónico sobre la lipasa, haciendo que el solvente orgánico polar no esté en contacto directo con el derivado.



**Figura 1.9.-** Inactivación térmica a 75°C de Novozyme 435 (círculos) y Novozyme 435 PEI (cuadrados) en T-amil alcohol. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos y la actividad se midió a 45°C en T-amil alcohol.

También se probó la reutilización del catalizador Novozyme 435 recubierto con PEI en la reacción de síntesis de oleato de ascórbilo. Tras 10 ciclos de reacción bajo las condiciones óptimas (derivado inclusive), el rendimiento de síntesis se mantuvo intacto después de 3 horas de reacción, alcanzándose un rendimiento de síntesis del 70%.

### 1.11.- Conclusión/Discusión.

Al probar diferentes solventes orgánicos polares para facilitar la solubilidad del ácido ascórbico se vio que el más adecuado de los estudiados fue el t-amil alcohol, ya que el catalizador que probamos en él fue muy estable manteniendo al 100% su actividad residual durante al menos 13 días y que solubilizaba bien el ácido ascórbico. Los rendimientos se mejoraron de manera drástica con temperatura alta (45°C), un ligero aumento de la concentración de aceite (dos veces respecto al ácido ascórbico) y en ausencia total de agua, ya que el agua puede competir fuertemente con el ácido ascórbico como aceptor en la reacción de transesterificación. Probamos a utilizar diferentes sustratos en la reacción y vimos que los resultados eran satisfactorios para otros oleos como el aceite de palma.

Los rendimientos de síntesis fueron muy diferentes para los distintos derivados de las lipasas seleccionadas, tanto para diferentes estrategias de inmovilización para una misma lipasa, como para las diferentes lipasas inmovilizadas con una misma estrategia. Los mejores resultados se correspondieron con la inmovilización iónica para TLL e hidrofóbica para CALB, siendo la inmovilización covalente desaconsejable en este tipo de reacción (rendimientos de síntesis prácticamente nulos). Un

recubrimiento adicional de los derivados con PEI mejora sustancialmente el rendimiento de síntesis y estabilidad. El resultado óptimo fue para CALB adsorbida sobre un soporte hidrófobo (Novozym 435) y recubierto con PEI, alcanzándose un rendimiento del 85% en comparación con el ácido ascórbico total. Con TLL adsorbida iónicamente también mejoraba el rendimiento cuando se recubría el derivado con PEI (desde un 22 a un 40%). Los derivados más activos resultaron ser también los más estables y se demostró que PEI puede incrementar aún más dicha estabilidad. A 75 °C el derivado hidrofóbico de CALB y recubierto con PEI fue dos veces más estable que el derivado sin recubrir, además se obtenía un rendimiento ligeramente mayor, por lo que dicho derivado fue el mejor candidato para nuestra reacción.

En condiciones óptimas de reacción el catalizador fue totalmente estable después de más de 28 días y se obtuvo un rendimiento de síntesis similar al inicial tras diez ciclos de reacción.

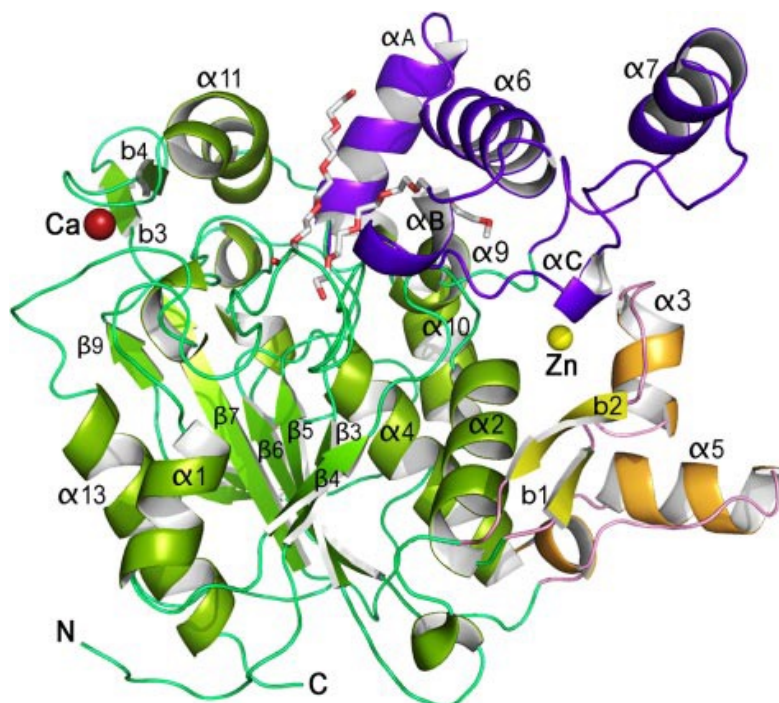
Los bajos rendimientos y estabilidad obtenidos para otros derivados de lipasas comerciales también son interesantes y muestran las limitaciones de las lipasas comerciales en disolventes orgánicos polares.

Podemos concluir que la condensación del aceite de oliva con ácido ascórbico en medios polares y anhidros catalizada por lipasas inmovilizadas parece ser un protocolo adecuado para la síntesis de antioxidantes liposolubles "naturales".



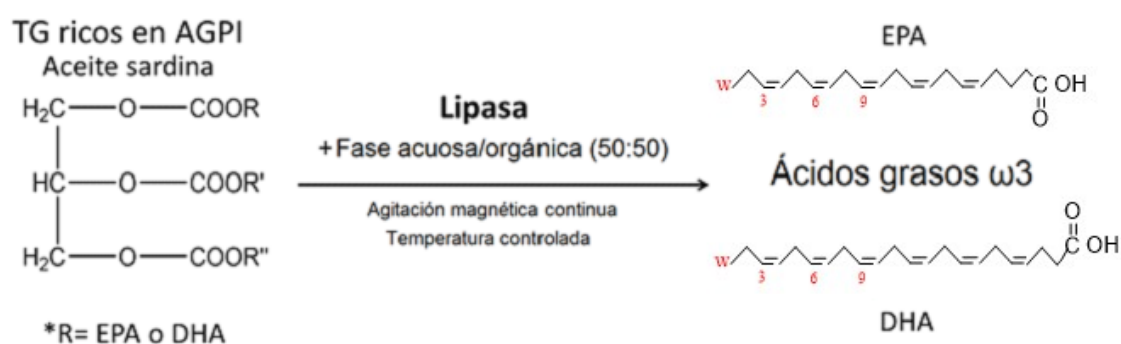
## 2.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2).

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio nos permitieron poner a punto la hidrólisis selectiva de aceite de pescado catalizada por lipasas inmovilizadas sobre soportes porosos. La hidrólisis constituye una alternativa para el primer paso en la obtención de ácidos  $\omega 3$  libres y su posterior utilización en la obtención de TG. La selectividad enzimática que podríamos lograr hacia EPA o DHA puede ser muy interesante para evitar posteriores procesos de purificación. En este capítulo de la Tesis, nos propusimos como objetivo mejorar aún más la selectividad de las lipasas para la hidrólisis del aceite, para ello, al disponer de una lipasa recombinante de estructura 3D conocida como es la BTL2, tanto de la forma abierta como la cerrada (figura 2), se realizó una serie de modificaciones químicas y genéticas para intentar mejorar sus propiedades catalíticas y hacerla más selectiva en la liberación de  $\omega 3$  durante la hidrólisis de aceite de pescado. Se realizaron tanto mutaciones puntuales conocidas, como evolución al azar con métodos de selección robustos en las condiciones para las cuales queríamos optimizar nuestra enzima (altas temperaturas y presencia de solventes orgánicos) que nos podrían permitir obtener variantes enzimáticas con propiedades mejoradas e incluso distintas a la enzima nativa.



**Figura 2-** Estructura 3D de la conformación abierta de BTL2. Tapadera o lid (residuos 169-239): morado, dominio zinc: amarillo, resto de la proteína: verde, cationes metálicos Calcio (rojo) y Zinc (amarillo) marcados en forma de esferas, dos moléculas de tritón X-100 en el centro activo: barras rojiblancas. (Carrasco-López, Godoy et al. 2009)

En cuanto a la reacción de hidrólisis de aceite de sardina se realizó en un sistema bifásico utilizando mezclas de agua y disolvente (Fernandez-Lorente, Filice et al. 2011). Una fase acuosa compuesta por tampón Tris donde va a poder realizarse la hidrólisis y una fase orgánica (ciclohexano) para solubilizar mejor el aceite y donde van a ir a parar los ácidos grasos liberados evitando la saponificación y posibles inhibiciones sobre la enzima. Esta mezcla bifásica se mantuvo en agitación magnética continua y a una temperatura constante para facilitar el transcurso de la reacción (Figura 2.1).



**Figura 2.1.-** Reacción enzimática de hidrólisis de aceite de pescado en un sistema bifásico.

A parte de utilizar esta lipasa debido a que conocíamos su estructura tridimensional, la escogimos porque presentaba la ventaja de provenir de un organismo termófilo. Las enzimas de microorganismos termófilos son muy interesantes por su termoestabilidad. El termófilo *Bacillus thermocatenuatus* (BTL) produce dos lipasas, llamadas BTL1 y BTL2 (Schmidt-Dannert, Sztajer et al. 1994, Schmidt-Dannert, Rúa et al. 1996). El gen para la lipasa BTL2 fue clonado y expresado en *Escherichia coli*. La lipasa de BTL2 es una proteína de 43 kDa que muestra alta estabilidad a 50°C, y pH alcalino (9,0–11,0) y en disolventes orgánicos (2-propanol, acetona, metanol). Estas propiedades hacen de la BTL2 una lipasa interesante para aplicaciones biotecnológicas (Luisa Rúa, Schmidt-Dannert et al. 1997).

Sin embargo, podría ser posible mejorar las características de dicha enzima mediante el empleo de técnicas de inmovilización, modificación química o ingeniería genética (Carrasco-López, Godoy et al. 2008) como se persigue en este estudio.

## 2.1.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL nativa inmovilizada mediante diferentes técnicas.

Se llevaron a cabo diferentes técnicas de inmovilización primero de la enzima en su estado nativo y después con los diferentes mutantes expuestos, y analizamos

actividad (expresada en nmol EPA+DHA sintetizados por minuto y por gramo de enzima inmovilizada) y selectividad EPA/DHA (expresada en porcentaje de síntesis de EPA respecto a DHA).

Lo primero que hicimos fue estudiar el comportamiento de la lipasa nativa en la reacción de hidrólisis bajo unas condiciones estándar, 25°C y pH 6. La lipasa se inmovilizó por adsorción hidrofóbica en soporte Octil-Sepharosa, unión covalente unipuntual a través del grupo amino más reactivo de la enzima (el amino terminal) con CNBr-Sepharose y UCM mediante la unión de grupos Glioxil del soporte con grupos amino de la enzima en el soporte Glioxil-Agarosa. Los resultados obtenidos con BTL2 fueron similares en cuanto a selectividad entre los diferentes soportes utilizados. Para la actividad sí se observaron diferencias, siendo ocho veces más activo el catalizador inmovilizado en Glioxil respecto al inmovilizado en Octil y setenta y dos veces más activo respecto al inmovilizado en bromocianógeno (tabla 2). Viendo estos resultados para la lipasa BTL2 en condiciones estándar, parece ser más adecuada la estrategia de UCM a la hora de llevar a cabo la hidrólisis de aceite de sardina catalizada por BTL2.

	Selectividad EPA/DHA	%EPA	% DHA	Actividad inicial
<b>Octil</b>	1.6	30	28	0.119
<b>CNBr</b>	1.34	16	18	0.014
<b>Glioxil</b>	1.68	5.03	4.49	0.999

**Tabla 2.-** Actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de la lipasa BTL nativa en la hidrólisis de aceite de pescado inmovilizada en diferentes soportes, pH6/25°C.

### 2.1.1.- Optimización de las condiciones de reacción para la hidrólisis enzimática de aceite de sardina catalizada por BTL2 nativa.

Probamos a variar las condiciones de reacción para ver si se modulaban las propiedades catalíticas, buscando siempre mejorar la selectividad y la velocidad de hidrólisis para el aceite de sardina.

Lo primero que se estudió fue el efecto del pH (5, 6 y 7) y la temperatura de reacción (4, 25 y 37°C), en ambos casos el estudio se realizó con el derivado octil, pero en ninguno de ellos las variaciones fueron significativas (tabla 2.1).

Condiciones	Selectividad EPA/DHA	%EPA	% DHA	Actividad inicial
<b>Estándar (25°C, pH6)</b>	1.6	30	28	0.119
<b>4°C, pH6</b>	2.01	21	16	0.079
<b>37°C, pH6</b>	1.78	14	12	0.334
<b>25°C, pH5</b>	1.71	36	31	0.140
<b>25°C, pH7</b>	1.7	32	28	0.127

**Tabla 2.1.-** Actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de la lipasa BTL en estado nativo inmovilizada en Octil, bajo diferentes condiciones de pH y temperatura.

Posteriormente lo que se estudió fue el efecto del co-disolvente en las condiciones estándar, para ello se probaron distintas concentraciones de propanol (desde 30 hasta 50%) con los diferentes soportes utilizados anteriormente. Como se puede observar en la tabla (2.2), la selectividad EPA/DHA varía tanto con el tipo de catalizador como con el porcentaje de propanol utilizado. Cuando se aumenta el porcentaje de propanol de un 30 a un 50% la selectividad pasa de 1,6 a 4,3 en el caso del Octil, en el caso del CnBr no hay cambios importantes y con el Glioxil se pasa de 1,68 a 4,14 con un 30% de propanol por lo que se mejora satisfactoriamente la selectividad. En cuanto a la actividad también el derivado glioxil la mejora con un 30% de disolvente aumentándola 2.3 veces más respecto a su igual en ausencia de disolvente.

	% Propanol	Selectividad EPA/DHA	%EPA	% DHA	Actividad inicial
<b>Octil</b>	0%	1.6	30	28	0.119
	30%	4.35	36	12	0.027
	50%	4.28	25	9	0.015
<b>CNBr</b>	0%	1.34	16	18	0.013
	30%	1.31	27	30	0.144
	50%	1.26	7	9	0.039
<b>Glioxil</b>	0%	1.68	5.03	4.49	0.999
	30%	4.14	14.85	5.38	2.301
	50%	1.97	5.26	4	0.993

**Tabla 2.2.-** Actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de la lipasa BTL en estado nativo inmovilizada en diferentes soportes, probando diferentes porcentajes de disolvente.

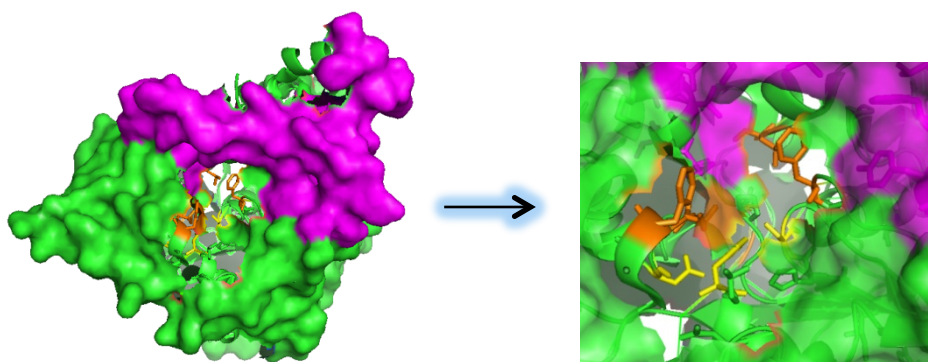
Por lo que parece ser que en algunos casos puede ser satisfactorio el uso de co-solventes que ayuden aún más a solubilizar los sustratos de la reacción mientras que la variación de temperatura y pH no parecen afectar significativamente a los valores de selectividad y actividad obtenidos para la hidrólisis del aceite de pescado.

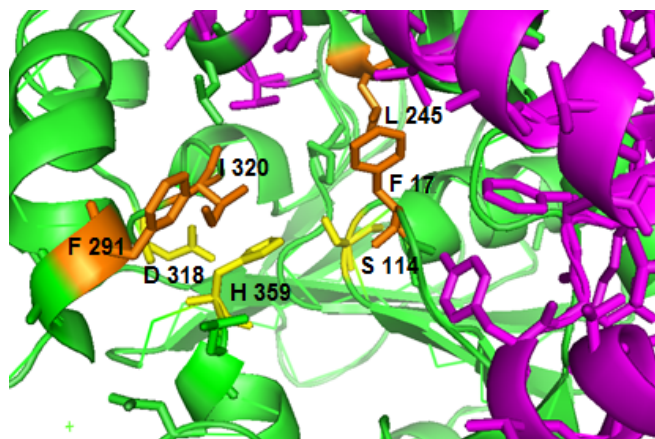
## 2.2.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado catalizada por derivados de BTL2 modificados.

Se llevó a cabo una serie de modificaciones específicas, tanto genética, química como una combinación de ambas para intentar mejorar las propiedades catalíticas de la lipasa BTL2 en la hidrólisis del aceite de pescado. Pretendíamos desarrollar mutantes de BTL2 con una única cisteína para llevar a cabo una modificación química dirigida en su centro activo con grupos prostéticos sintéticos que alterasen las propiedades catalíticas de los enzimas semi-sintéticos resultantes. Además, el cambio de un aminoácido hidrofóbico más grande por uno más polar y pequeño como es la cisteína, quizás podría alterar las propiedades de selectividad de la hidrólisis de los aceites de pescado previamente a la modificación química.

### 2.2.1.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL modificada genéticamente en posiciones puntuales.

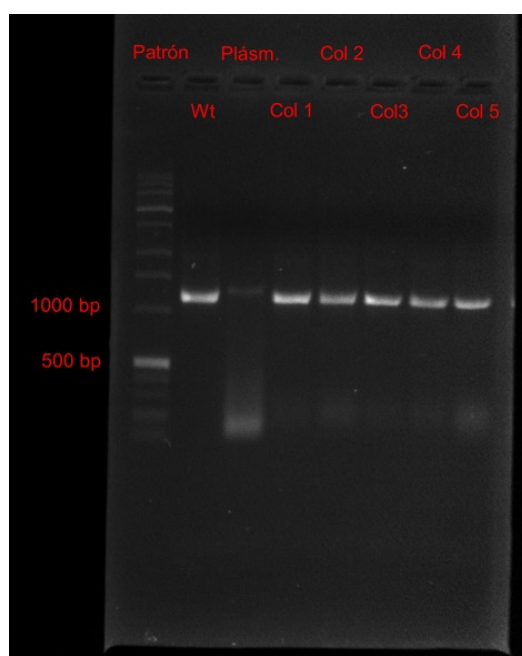
Se llevaron a cabo mutaciones genéticas en residuos específicos del centro activo que podrían ser clave para modular las propiedades catalíticas. Las mutaciones que se llevaron a cabo fueron la sustitución de diferentes aminoácidos por cisteínas. Por un lado se mutaron tres residuos cercanos a la tríada catalítica, Fenilalanina 17 (F17C), Leucina 245 (L245C) e Isoleucina 320 (I320C). Por otro se realizó la mutación en un residuo cercano al lugar de entrada del sustrato, Fenilalanina 291 (F291C). Figura 2.2. También se probó a construir un mutante doble, F291C-I320C, combinando dos de las mutaciones simples anteriores.





**Figura 2.2.-** Disposición de los residuos escogidos para la mutación puntual por cisteínas en la estructura tridimensional de la conformación abierta de BTL2. Amarillo: tríada catalítica, Naranja: residuos seleccionados, Verde: estructura proteica, Morado: tapadera o lid.

En primer lugar se sintetizó en el laboratorio una BTL2 nativa desprovista de cisteínas (fueron intercambiadas por serinas) (Godoy, Rivas et al. 2011). Los mutantes se construyeron por mutagénesis dirigida, las mutaciones fueron corroboradas por secuenciación y las enzimas mutadas fueron expresadas en *E.coli* bajo las condiciones óptimas descritas en materiales y métodos. En la figura 2.3 se puede ver como el gen de BTL2 permanece intacto después de llevar a cabo las mutaciones puntuales.



**Figura 2.3.-** Gel de DNA. Primera línea Patrón, seguida de Wt: PCR BTL2 nativa, Plásm: plásmido de BTL2 y Col 1-5: PCR del DNA extraído de las colonias de los mutantes obtenidos.

Se lograron obtener todos los mutantes (F17C, L245C, I320C y F291C-I320C), salvo en el caso de F291C en solitario que no fue posible realizar la mutación. Por último se



produjeron las lipasas mutantes y se inmovilizaron en los tres tipos de soporte definidos (Octil, CNBr y Glioxil) bajo las condiciones estándar y se analizaron las propiedades catalíticas en la reacción de hidrólisis del aceite de pescado.

En el caso de la selectividad el mejor mutante que observamos fue el doble (F291C-I320C) del glioxil que pasa de tener una selectividad EPA/DHA de 1.68 a 4.31 (2.5 veces superior), el cual combina una mutación cercana al centro activo con una de entrada al sustrato que puede estar relacionada con este incremento en la selectividad, tabla 2.3. En cuanto a la actividad se pudo ver que el mejor mutante fue el 245 inmovilizado sobre Glioxil, aumentando su actividad respecto al mismo mutante inmovilizado en CNBr (en más de 150 veces), en Octil (16 veces) y respecto a la enzima nativa inmovilizada sobre los tres soportes (2.67 veces para el caso de glioxil) como se puede ver en la tabla 2.3. Aunque en cuanto a selectividad no hay claras diferencias según el soporte utilizado si las hay en cuanto a actividad, siendo más bajas cuando la enzima se encuentra inmovilizada por un solo punto a CNBr ya que se está emulando su comportamiento como enzima libre, unas diez veces superior cuando inmovilizamos a la enzima de forma hidrofóbica en octil, y unas cien veces cuando está inmovilizada sobre glioxil y la unión es de tipo multipuntual, por lo que dicha interacción entre la enzima y el soporte nos permite mejorar en gran cantidad su actividad expresada en dicha reacción de hidrólisis tanto para la enzima nativa como con los mutantes generados.

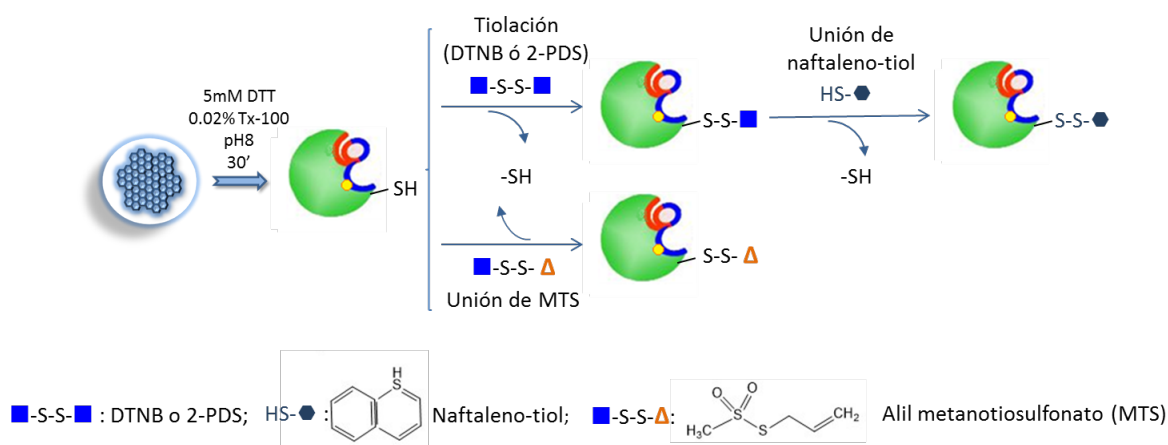
	CNBr		Octil		Glioxil	
	Selectividad EPA/DHA	Actividad inicial	Selectividad EPA/DHA	Actividad inicial	Selectividad EPA/DHA	Actividad inicial
<b>Nativa</b>	1.34	0.013	1.6	0.119	1.68	0.999
<b>F17C</b>	1.09	0.007	1.15	0.075	3.3	1.110
<b>L245C</b>	1.45	0.016	1.37	0.166	1.28	2.670
<b>I320C</b>	1.71	0.035	1.55	0.164	2.42	0.333
<b>F291C-I320C</b>	1.95	0.007	2.04	0.081	4.31	0.938

**Tabla 2.3.-** Actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de la lipasa BTL en estado nativo y diferentes mutantes en CNBr, Octil y Glioxil, pH6/25°C.

Con los mejores mutantes en condiciones estándar en cuanto a selectividad y actividad se probó a modificar las condiciones de pH, temperatura y porcentajes de propanol como se hizo para la enzima nativa pero no se obtuvieron diferencias significativas, se mantuvieron los mismos valores ya mejorados con la mutación, dichos resultados no se muestran.

### 2.2.2.- Efecto de la modificación química en la superficie de BTL para la hidrólisis del aceite de sardina.

Llevamos a cabo modificaciones químicas dirigidas en residuos específicos clave para modular las propiedades catalíticas. La estrategia que abordamos consistió en modificar químicamente los mutantes obtenidos en el apartado anterior, introduciendo nuevos grupos mediante un enlace disulfuro entre la cisteína introducida genéticamente y los siguientes compuestos químicos: Alil metanotiosulfonato y Naftaleno modificado con un grupo tiol.



**Figura 2.4.-** Formación del enlace disulfuro entre el grupo tiol de la cisteína introducida genéticamente y el tiol del compuesto ofrecido para la modificación química.

Es importante destacar que estos mutantes se construyeron sobre un mutante BTL2 carente de cisteínas, lo que nos aseguraba la especificidad del grupo prostético artificial por el único grupo tiol presente en la estructura del enzima; la cisteína introducida por mutagénesis dirigida. Nuestro objetivo era enriquecer la aromaticidad del centro activo para lograr favorecer las interacciones hidrofóbicas entre el sustrato y su zona de unión en el centro activo de la proteína. Además, puesto que la inmovilización en Glioxil nos daban los mejores resultados, llevamos a cabo todas las modificaciones en fase sólida usando como base los mutantes inmovilizados en dicho soporte.

#### 2.2.2.1.- Alil metanotiosulfonato.

Al introducir el compuesto Alil metanotiosulfonato, la selectividad aumenta ligeramente en el caso del mutante en la posición 17 y 320 en Glioxil respecto a la enzima nativa. En cuanto a la actividad, en todos los casos es mejor la mostrada por la enzima nativa (tabla 2.5).



	Glioxil	
	Selectividad EPA/DHA	Actividad inicial
<b>Nativa</b>	1.68	0.999
<b>17</b>	2.09	0.001
<b>245</b>	1.49	0.001
<b>320</b>	2.23	0.002
<b>291.320</b>	0.53	0.000

**Tabla 2.5.-** Efecto de la modificación química en la actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de los mutantes de BTL con Allyl Methanethiosulfonate en Glioxil, pH6 y 25°C para la hidrólisis del aceite de sardina.

#### 2.2.2.2.- Naftaleno-tiol.

La modificación química con Naftaleno-tiol, mostró como mejor derivado también el modificado en la posición 320, en el que la selectividad aumenta en 2 veces y la actividad en 2.7 veces respecto a la nativa (tabla 2.6), mientras que para las demás posiciones mutadas al igual que pasaba al introducir el alil metanosulfonato se ve disminuída considerablemente respecto a la enzima nativa, aunque en este caso la caída no es tan grande, y la selectividad se mantiene o aumenta ligeramente.

	Glioxil	
	Selectividad EPA/DHA	Actividad inicial
<b>Nativa</b>	1.68	0.999
<b>17</b>	2.03	0.278
<b>245</b>	1.58	0.255
<b>320</b>	3.29	2.690
<b>291.320</b>	2.31	0.417

**Tabla 2.6.-** Efecto de la modificación química en la actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de los mutantes de BTL con Naftaleno en Glioxil, pH6 y 25°C.

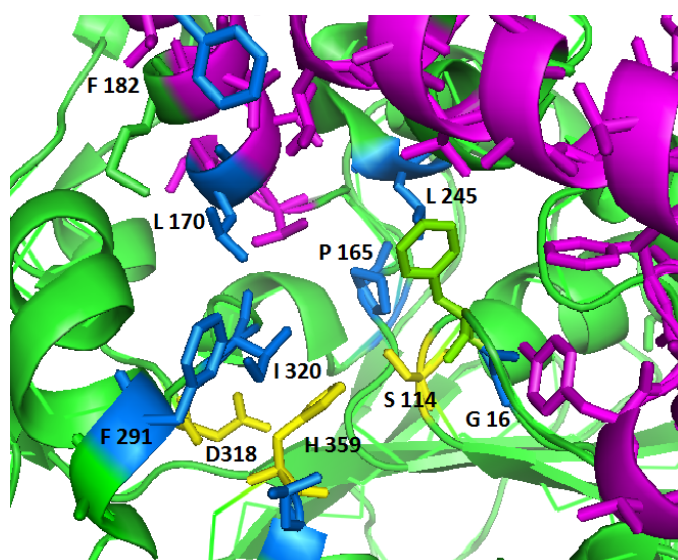
A la vista de los resultados podemos concluir, que la posición 320 de la molécula de BTL, es una posición clave en cuanto selectividad y actividad a la hora de llevar a cabo la hidrólisis de aceite de sardina. Cuando modificamos dicha posición con un compuesto químico afín a los sustratos se facilita la acción enzimática de la lipasa sobre los  $\omega$ 3.

Además si nos fijamos en las diferentes formas del alil y del naftaleno, podría ser que la enzima necesitara un grupo bastante polar o al menos grande para unir bien el sustrato, el grupo alil no es suficiente y eso explicaría la menor unión del sustrato y la repercusión en los valores de actividad que expresan los mutantes modificados químicamente con dichos grupos. Sin embargo al introducir en dicha posición el naftaleno, conseguimos mejorar considerablemente tanto la actividad como la selectividad.

Con los mejores mutantes en condiciones estándar en cuanto a selectividad y actividad se probó a modificar las condiciones de pH, temperatura y porcentajes de propanol como se hizo para la enzima nativa pero no se obtuvieron diferencias significativas, se mantuvieron los mismos valores ya mejorados con la mutación, dichos resultados no se muestran.

### 2.2.3.- Hidrólisis enzimática de aceite de pescado con BTL modificada genéticamente mediante mutagénesis al azar.

Se llevaron a cabo mutaciones a saturación en un mismo residuo por diferentes tipos de aminoácidos para ver si éramos capaces de modular las propiedades catalíticas de BTL2. Estas modificaciones al azar se llevaron a cabo en residuos cercanos a la tríada catalítica (Glicina 16, Fenilalanina 165, Leucina 245, Isoleucina 320, y Leucina 360) y residuos cercanos al lugar de entrada del sustrato (Leucina 171, Fenilalanina 182 y Fenilalanina 291).



**Figura 2.5.-** Disposición de los residuos escogidos para la mutagénesis al azar en la estructura tridimensional de la conformación abierta de BTL2. Amarillo: tríada catalítica, Azul: residuos seleccionados, Verde: superficie proteica, Morado: tapadera o lid.

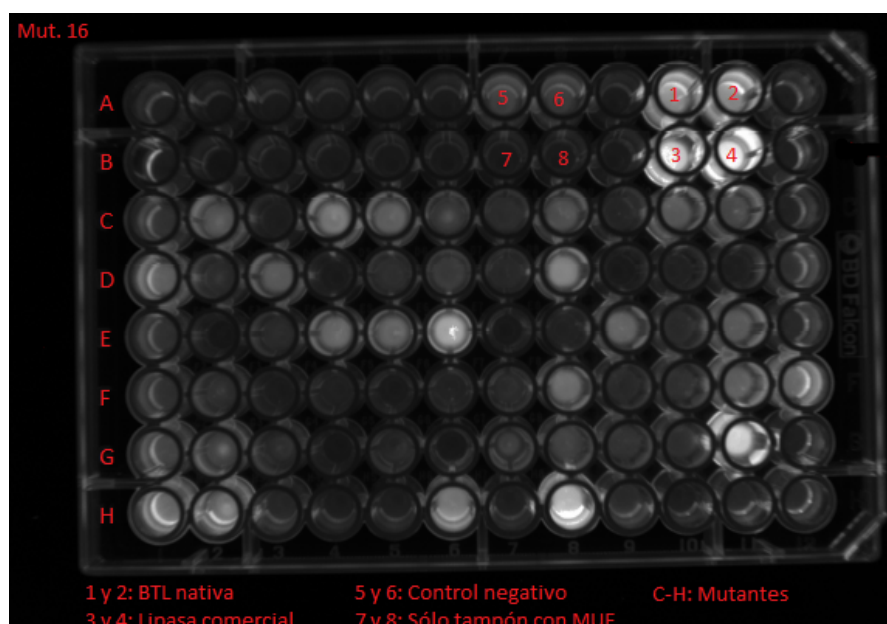
#### 2.2.3.1.- Método de mutagénesis.

Para llevar a cabo la mutagénesis al azar se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con unos cebadores de tipo NDT. Estos cebadores permiten generar en la posición deseada doce codones diferentes. El resultado es la obtención de una mezcla de mutantes con una diversidad de hasta 12 aminoácidos diferentes en esa posición. Esta mezcla contiene representadas cada una de las características físico-químicas que encontramos en las cadenas laterales de los 20 aminoácidos (polares y no

polares, alifáticos y aromáticos, con carga negativa y positiva). De este modo reducimos el número de mutantes a cribar y reducimos la generación de mutantes semejantes estructuralmente que nos conducen a funcionalidades similares. Existen otros tipos de cebadores que abarcan de forma más precisa la diversidad química de las cadenas laterales de los 20 aminoácidos naturales; estos son NNK que generan hasta veinte codones diferentes, sin embargo nos encontramos referencias bibliográficas que relatan resultados menos satisfactorios debido al aumento de potenciales variantes que reduce la eficiencia del cribado funcional (Reetz, Kahakeaw et al. 2008). En base a esto se construyó una biblioteca de productos génicos usando el codón NDT para cada una de las posiciones.

### **2.2.3.2.- Métodos de cribado molecular para seleccionar los mutantes más activos.**

Nos centramos en una sola librería para hacer todos los ensayos sobre los posibles métodos de selección y cribado funcional. Después de realizar bastantes pruebas nos decantamos por uno de dos pasos que incluía un método de selección en placa de cultivo y un método de cribado funcional en placa multipocillo. El primer paso consiste en ver la presencia o ausencia de producción por parte de la colonia bacteriana de lipasa, es decir, un estudio cualitativo, ya que la mayoría de estructuras proteicas son tan complejas que es casi imposible predecir cómo el cambio de sus estructuras afectará a la expresión del producto génico, a nivel de plegamiento de la proteína y finalmente a sus funciones. Para éste paso el sustrato que se utilizó fue 4-methylumbelliferone (MUF), el cual detecta la presencia de lipasa incluso en el cultivo bacteriano bajo luz ultravioleta (Diaz, Prim et al. 1999). Se seleccionaron sólo aquellos mutantes que poseían la mayor fluorescencia con este ensayo.



**Figura 2.6.-** Ensayo cualitativo de presencia de lipasas con MUF. Los pocillos 1-4 son controles positivos (1 y 2: BTL nativa producida en las mismas condiciones que los mutantes + MUF; 3 y 4: lipasa comercial + MUF), pocillos 5-8 controles negativos (5 y 6: BL21 sin el plásmido crecido en las mismas condiciones que los mutantes + MUF; 7 y 8: Tampón y medio +MUF) y el resto de calles (C-H) corresponden a mutantes de BTL en la posición 16 + MUF.

También se realizó un ensayo en placa con tributirina (tabla 2.7) de las diferentes colonias obtenidas para los diferentes mutantes comprobando que aquellos que generaban mayor fluorescencia también eran los que formaban un halo con mayor diámetro (Messias, da Costa et al. 2009). No utilizamos otro sustrato más específico para lipasas ni rodamina ya que sabemos que sólo poseíamos una lipasa y queríamos seleccionar aquellos mutantes que produjeran un mayor tamaño de halo (Lawrence, Fryer et al. 1967, Kouker and Jaeger 1987).

BTL	Colonia (cm)	Halo + Colonia (cm)	Halo+Colonia/Colonia (cm)
<b>Nativa</b>	1.1	3.5	3.18
<b>245,2</b>	0.9	2.6	2.88
<b>171,3</b>	1	2.7	2.7
<b>171,5</b>	1.1	2.7	2.45
<b>291,5</b>	1	1.4	1.4
<b>16,5</b>	0.9	1.1	1.2

**Tabla 2.7.-** Formación de halo en placas de tributirina por parte de algunos de los mutantes.

Una vez seleccionados los mejores mutantes en cuanto al ensayo con MUF y tributirina, se realizó un segundo paso de cribado molecular con la proteína aislada para cuantificar el efecto de la mutación en la actividad. Esto fue posible gracias a un

ensayo colorimétrico e intensivo de actividad esterásica usando el *p*-nitrofenol butirato como sustrato y midiendo a 348nm. De este modo pudimos determinar los más activos a nivel de proteína y no tanto debido a mejoras en la expresión del clon recombinante. La tabla (2.8) muestra los mejores mutantes escogidos debido a los ensayos anteriores. Los mutantes más activos pertenecieron a las posiciones 16, 171 y 245.

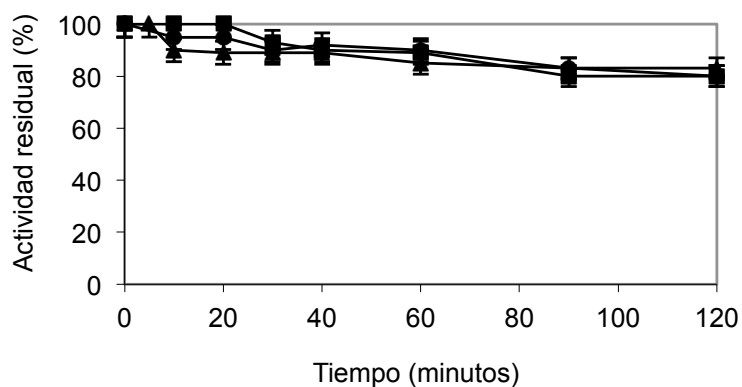
<b>BTL</b>	<b>Actividad (U/ml)</b>	<b>[Proteína] (mg/ml)</b>	<b>UI/mg</b>
<b>Nativa</b>	96.86	2.74	35.33
<b>16.1</b>	73.42	2.21	33.19
<b>16.3</b>	88.36	2.06	42.82
<b>171.1</b>	88.84	2.21	40.16
<b>171.2</b>	70.18	2.72	25.80
<b>171.3</b>	70.18	2.72	25.80
<b>171.5</b>	67.43	1.77	38.16
<b>171.8</b>	71.83	2.70	35.31
<b>245.1</b>	126.95	2.49	51.04
<b>245.2</b>	71.80	2.68	35.53

**Tabla 2.8.-** Mutantes de la lipasa BTL más activos. Previamente seleccionados por MUF y tributirina. Los valores mostrados en la tabla son los obtenidos mediante ensayo con pnpb y bradford.

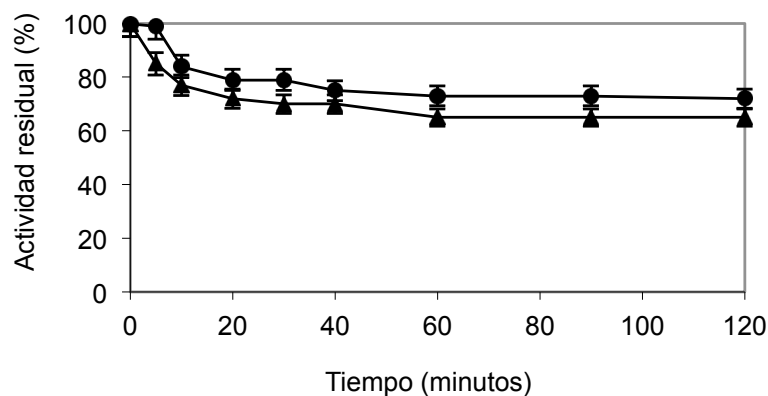
Los valores de actividad de las mejores variantes obtenidas fueron próximos a la enzima nativa, el mejor resultado fue para un mutante de la posición 245 con un valor de 51 unidades por mg de proteína que supera en 1.5 veces a la enzima nativa.

### 2.2.3.3.- Estabilidad de los mutantes seleccionados.

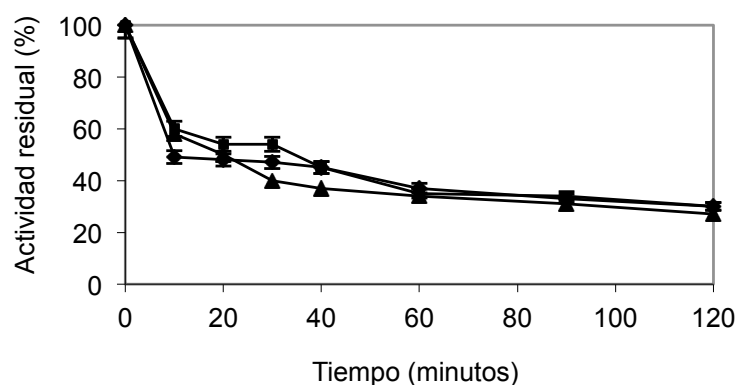
Después de seleccionar las variantes más activas se analizó la estabilidad de éstas comparando con la proteína nativa. Probamos primero la estabilidad de la BTL soluble viendo que era muy estable para algunas condiciones y para otras se estropeaba rápidamente. Nos decantamos por inmovilizar la proteína en Bromocianógeno en la que debía permanecer más estable ya que no se producen fenómenos de agregación y la enzima se inmoviliza por un solo punto manteniéndose así su conformación natural. Se estudió su estabilidad bajo tres condiciones diferentes para asegurarme que los resultados eran lo más fiable posibles: 40°C y 15% dioxano, 50°C y 15% acetonitrilo y 70°C en ausencia de disolvente.



**Figura 2.7.-** Estabilidad de BTL nativa (triángulos) y los mutantes 171.5 (círculos) y 245.2 (cuadrados) inmovilizados en CNBr a 40°C y 15% de dioxano.



**Figura 2.8.-** Estabilidad de BTL nativa (triángulos) y el mutante 16.3 (círculos) inmovilizados en CNBr a 50°C y 15% de acetonitrilo.



**Figura 2.9.-** Estabilidad de BTL nativa (triángulos) y los mutantes 171.1 (rombos) y 171.5 (cuadrados) inmovilizados en CNBr a 70°C.

En todas las condiciones todos los mutantes fueron muy estables y próximos a la proteína nativa por lo que se vio que eran buenos candidatos para probar en la

reacción de hidrólisis. En las figuras (2.7, 2.8 y 2.9) se muestran algunos de los resultados de estabilidad obtenidos para los mutantes estudiados.

#### 2.2.3.4.- Efecto de la estrategia de inmovilización para los mutantes diseñados, en la hidrólisis del aceite de sardina.

Se inmovilizó la enzima nativa y los mutantes seleccionados en bromocianógeno y octil y se analizó el porcentaje de actividad recuperada y la carga enzimática de cada catalizador. Escogimos la inmovilización en Octil en vez de Glioxil porque en esta reacción lo que más nos interesa es obtener una alta selectividad hacia uno de los ácidos  $\omega 3$  y era para dicho soporte con el que habíamos obtenido mejores resultados para dicha variable.

	Octil		CNBr	
BTL	%Act.Recuperada	U/gramo	%Act.Recuperada	U/gramo
Nativa	149	5134	43	2297
16.1	68	2543	49	2181
16.3	99	4599	41	2798
171.1	133	4000	46	2749
171.2	115	4326	15	659
171.3	79	5200	28	2940
171.5	71	3868	29	2358
171.8	78	4016	47	3541
245.1	88	4405	34	2547
245.2	43	3563	28	3074

**Tabla 2.9.-** Porcentaje de actividad recuperada y UI por gramos de catalizador de los diferentes mutantes de BTL inmovilizados en Octil y CNBr con el ensayo del PNPB.

Como se puede ver en la tabla 2.9 la actividad recuperada después de la inmovilización es mejor en el caso del octil incluso llegándose a hiperactivar con la unión en algunos casos (nativa, 171.1 y 171.2; con unos valores de actividad recuperada del 149%, 133% y 115% respectivamente), mientras que con el bromocianógeno el máximo que se puede recuperar es en torno a un 50%, por ejemplo en el caso del mutante 16.1. También estudiamos el comportamiento de los mutantes para la hidrólisis de aceite de sardina, en condiciones estándar, pH6 y 25°C, pero no se obtuvieron diferencias significativas al compararlos con la enzima nativa para ninguna de las dos variables, tabla 2.10.

BTL	Otil		CNBr	
	Actividad	Selectividad EPA/DHA	Actividad	Selectividad EPA/DHA
<b>Nativa</b>	0.285	1.72	0.056	1.62
<b>16.1</b>	0.322	1.59	0.025	1.68
<b>16.3</b>	0.225	1.74	0.039	1.62
<b>171.1</b>	0.286	1.58	0.045	1.63
<b>171.2</b>	0.281	1.59	0.039	1.58
<b>171.3</b>	0.218	1.78	0.041	1.84
<b>171.5</b>	0.265	1.60	0.025	1.56
<b>171.8</b>	0.295	1.72	0.030	1.99
<b>245.1</b>	0.283	1.52	0.015	1.41
<b>245.2</b>	0.151	1.50	0.009	1.19

**Tabla 2.10.-** Comparación en la hidrólisis de pescado de la actividad inicial (nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado con un 10% de conversión) y selectividad (relación molar entre el EPA y DHA) de los derivados obtenida con BTL nativa y los mejores mutantes seleccionados en cuanto a actividad de partida con PNPB.

### 2.3.- Conclusión/Discusión.

En este capítulo vemos cómo es posible modular las propiedades catalíticas de una proteína modificando el medio de reacción, el tipo de inmovilización o mediante modificación de su estructura genética o química.

Lo primero a destacar fue que diferentes inmovilizaciones de la enzima nativa dieron muy distinta actividad, mientras que la selectividad bajo dichas variables no se vio afectada. Los resultados obtenidos con BTL2 fueron similares en cuanto a selectividad entre los diferentes soportes utilizados, sin embargo hubo una clara tendencia en cuanto a actividad se refiere, siendo el glioxil el mejor soporte, por lo que se pone de manifiesto que la orientación y tipo de inmovilización puede influir en la mejora de esta propiedad, pareciendo ser mejor la UCM. La presencia de un porcentaje de co-disolvente pudo mejorar la selectividad y la actividad en algunos casos ya que se mejora la solubilidad entre los diferentes sustratos. Los mejores resultados en cuanto a selectividad y actividad se obtuvieron con glioxil en presencia de un 30% de propanol. Al variar el pH y la temperatura no obtuvimos diferencias significativas.

También vimos que es posible modificar las propiedades de la enzima mediante mutaciones genéticas o químicas del centro activo u otra región del enzima. Estas técnicas permitieron introducir de manera selectiva e inequívoca diferentes aminoácidos o grupos prostéticos artificiales (grupos aromáticos y grupos alilo) en una



posición determinada del centro activo, modificando su disposición espacial así como sus propiedades físico-químicas. En general no se empeoraron, se mantuvieron o mejoraron las propiedades, tanto en actividad como en selectividad.

En el caso de las mutaciones genéticas en las condiciones estándar de reacción se consiguió aumentar la selectividad en los tres soportes donde la modificación que realizamos fue sustituir sus dos aminoácidos originales (291 y 320) por dos cisteínas, este mutante combina una mutación cercana al centro activo con una cercana a la entrada del sustrato. El mejor resultado fue para la inmovilización en glioxil que aumentó en 2.5 veces la selectividad respecto a la enzima nativa inmovilizada en el mismo soporte. En cuanto a actividad los mejores resultados se obtuvieron de nuevo con glioxil, donde en todos los casos fue superior al resto de inmovilizaciones, y el mejor fue el mutante 245 que incrementó en 2.6 veces la actividad respecto a la nativa inmovilizada en el mismo soporte. Hemos sustituido aminoácidos hidrofóbicos por cisteína, que es bastante más polar y además más pequeña. Por lo que tiene dos efectos, uno estérico porque abre hueco en el centro activo y otro físico-químico porque tiene un centro activo más polar, que en determinadas posiciones cercanas al centro activo, como pudiera ser la 245, quizás facilitara el acceso del sustrato y la interacción con la tríada catalítica. Es curioso que cuando en el doble mutante se quita la fenilalanina y se sustituye por una cisteína en la posición 291 mejora mucho la selectividad con respecto al mutante simple I320C, pero como no tenemos el mutante simple F291C no podemos saber si el efecto es combinado o solo de la posición 291.

En cuanto a la incorporación de grupos aromáticos y alilo en las posiciones anteriormente modificadas genéticamente el mejor mutante fue el 320, el cual incrementó los valores de selectividad tanto con los grupos aromáticos como los grupos alilo y de actividad aunque sólo en el caso del naftaleno, quien incrementó la actividad específica de la enzima inmovilizada en 2.69 veces respecto a la enzima nativa inmovilizada en el mismo soporte. Se probó a cambiar las condiciones del medio para dichas variantes pero no se logró incrementar los valores ya mejorados con la modificación química respecto a la nativa.

Por lo que fuimos capaces de aumentar los valores de actividad y selectividad de nuestra enzima con las modificaciones sólo genéticas, y de obtener resultados aún más satisfactorios cuando se combinaron ambas estrategias (modificación genética y química), llegando a obtener una selectividad de 3.29 y una actividad de 2.69 cuando introducimos en la posición 320 el grupo aromático naftaleno.

Viendo lo que ocurre se podría interpretar que las propiedades catalíticas de la BTL2 en la reacción de interés podrían verse mejoradas con la sustitución del aminoácido de la posición 245 por uno pequeño y polar para permitir que se dé una mejor interacción con la serina catalítica y en la posición 320 por un grupo grande y afín que pudiera atraer el sustrato por homología estructural.

La mutación mediante primers NDT parece ser un buen método para obtener una gran cantidad de mutantes. El screening mediante MUF y tributirina es un método fiable para estudiar en placa la actividad de una lipasa sin necesidad de realizar su producción en gran cantidad. Los mejores mutantes obtenidos en cuanto a actividad fueron los de las posiciones 16, 171 y 245, al mutar los demás residuos cercanos al centro activo la enzima se vio afectada en su actividad negativamente. La estabilidad de los mutantes escogidos fue muy buena y similar a la enzima nativa en las condiciones estudiadas (80% actividad residual después de 120 minutos a 40°C y un 15% de dioxano). En cuanto a la reacción de hidrólisis bajo las condiciones estudiadas, la selectividad y actividad se mantuvieron igualmente próximas a la enzima nativa.

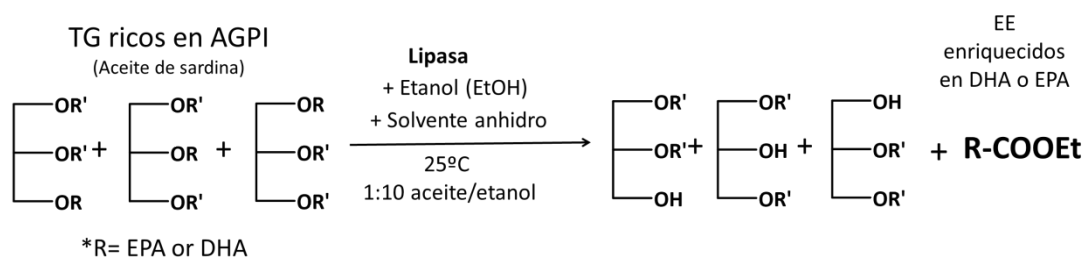
El mejor resultado obtenido viendo todas las variaciones estudiadas correspondió en cuanto selectividad con un valor de 4.35 a la enzima nativa inmovilizada en octil con un 30% de propanol en el medio de reacción, en cuanto actividad al mutante I320C en el que se ha introducido naftaleno obteniéndose un valor de velocidad de hidrólisis de 2.69 nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado y en conjunto el mejor resultado correspondió a la enzima nativa inmovilizada en glioxil en presencia de un 30% de propanol en el medio obteniendo una selectividad de 4.14 y una actividad de 2.3 nmoles de PUFAs por minuto y mg de derivado.

### 3.- Obtención de esteres etílicos de $\omega$ -3 por etanolisis de aceite de sardina catalizada por lipasas inmovilizadas.

Como se comentó en la introducción gracias a la etanolisis de aceite de pescado podemos obtener ésteres etílicos de AGPI aptos para el consumo alimentario ya que poseen ciertas características que pueden resultar beneficiosas para la salud.

Este tipo de reacciones se pueden llevar a cabo a partir de los AG libres o del TG directamente. El método más interesante es a partir del aceite directamente debido a que se parte del sustrato natural.

Estudiamos la etanolisis de un aceite de pescado rico en PUFAS, como es el aceite de sardina con un contenido de EPA del 18% y de DHA del 12%, en presencia de solventes. Como biocatalizador utilizamos diferentes lipasas comerciales inmovilizadas mediante diferentes estrategias a resinas acrílicas, además se utilizaron solventes como medio de reacción ya que pueden ofrecer ciertas ventajas como una mayor solubilidad entre los sustratos de la reacción. Para q el transcurso de la reacción vaya hacia la síntesis y no hacia la hidrolisis es necesario el uso de medios de reacción totalmente anhidros, para ello se utilizó tamiz molecular. Las condiciones de temperatura fueron suaves, 25°C, y una agitación orbital de 150 rpm, y se utilizó una relación molar mayor de etanol que de aceite (1/10) para que pudiera reaccionar todo el TG.



**Imagen 3.-** Reacción de etanolisis de aceite de pescado en presencia de solventes orgánicos catalizada por lipasas inmovilizadas.

El objetivo de este capítulo fue hacer un estudio exhaustivo del catalizador q nos permitirá obtener un alto rendimiento de reacción y un alta selectividad hacia la formación de uno de los dos posibles esteres etílicos para que posteriormente no se tuvieran que llevar a cabo tediosos métodos de purificación.

### 3.1.- Efecto del disolvente sobre las propiedades catalíticas de lipasas inmovilizadas en la etanolisis del aceite de sardina.

Las cuatro lipasas comerciales (CALB, RML, TLL y Lecitasa) con las que trabajamos se inmovilizaron por adsorción hidrofóbica a Sepabeads C18, de forma que orientamos la enzima hacia el centro activo, quedando éste permanentemente abierto de forma que puede acceder más fácilmente el sustrato y a la vez protegido en parte por el propio soporte del solvente presente en el medio de reacción. Lo primero que estudiamos fue el efecto del disolvente utilizado como medio de reacción sobre las propiedades catalíticas de las lipasas inmovilizadas. La etanolisis del aceite de pescado se estudió a 25°C y en presencia de dos solventes anhidros, ciclohexano y t-amil alcohol. Se estudió tanto la actividad de los catalizadores como la selectividad EE-EPA/EE-DHA.

En el caso de CALB la selectividad de EPA frente a DHA es muy baja en ambos solventes y la actividad es 20 veces mejor en el caso del t-amil alcohol. En el caso de RML la actividad inicial es mejor en presencia de t-amil alcohol pero la selectividad es igual de buena en ambos, llegando a un valor de 13. TLL tiene una buena actividad inicial en ambos solventes mientras que su selectividad es bastante mayor en presencia de ciclohexano llegando a un valor de 29. La Lecitasa tiene una mejor actividad inicial en presencia de t-amil alcohol, pero en ambos casos son valores muy bajos, la selectividad EPA/DHA también es mejor en t-amil alcohol, llegando a un valor de 20.5, (tabla 3).

Solvente	Lipasa	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad EPA/DHA
<b>Ciclohexano</b>	<b>CALB</b>	0.07	3
	<b>RML</b>	0.25	13
	<b>TLL</b>	2.24	29
	<b>Lecitasa</b>	0.04	17.7
<b>T-amil Alcohol</b>	<b>CALB</b>	1.37	1
	<b>RML</b>	0.40	13
	<b>TLL</b>	2.38	8
	<b>Lecitasa</b>	0.11	20.5

**Tabla 3.-** Actividad inicial para la etanolisis de aceite de pescado de diferentes lipasas inmovilizadas en Sepabeads C18. Condiciones: 25°C, relación 1/10 aceite/etanol. La actividad inicial se expresa como micro moles de etil ésteres de PUFA (EEEPA+EEDHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

Con estos resultados podemos ver como variando las condiciones de reacción, en función del disolvente usado, los resultados obtenidos para la etanolisis del aceite son totalmente distintos en cuanto a selectividad y actividad. En principio para este soporte, Sepabeads C18, CALB se comporta igual en ambos solventes, RML y Lecitasa poseen mejores propiedades en t-amil alcohol y TLL en presencia de ciclohexano.

### **3.2.- Efecto de la estrategia de inmovilización sobre las propiedades catalíticas de lipasas en la reacción de etanolisis de aceite de pescado.**

En este apartado se ha estudiado como se pueden modular las propiedades catalíticas de una lipasa utilizando diferentes estrategias de inmovilización, ya que según la estrategia utilizada la orientación de la enzima es completamente distinta y ello provoca cambios en cuanto a actividad y selectividad. En este caso, hemos estudiado dos estrategias de inmovilización, ambas por adsorción, en un caso adsorción hidrofóbica, utilizando como soporte de inmovilización, dos resinas con propiedades distintas (Sepabeads C18 y Lewatit 1600) orientando la lipasa por el centro activo y el otro caso una estrategia de adsorción por intercambio iónico (Duolite) orientando la inmovilización hacia la zona más rica en cargas negativas, ya que el soporte posee en su superficie grupos activados con carga positiva. Estudiamos la actividad y selectividad EE-EPA/EE-DHA en presencia de ciclohexano y t-amil alcohol.

Para CALB se hizo el mismo estudio pero los resultados obtenidos en cuanto a actividad y selectividad no fueron buenos, obtuvimos unos resultados próximos a los obtenidos con Sepabeads C18, por ello no se muestran en la memoria.

Para RML como se puede ver en la tabla (3.1) los mejores resultados en cuanto a selectividad fueron para la inmovilización hidrofóbica en Sepabeads C18 para ambos solventes, llegando a un 13 de selectividad. Lo mismo ocurrió en términos de actividad inicial, con Sepabeads C18 se obtuvieron los mejores resultados, llegando a un valor en t-amil alcohol de 0.40 UI/min.

Solvente	Soporte	Actividad inicial (UI/min)	Selectividad
Ciclohexano	Duo.	0.06	2.5
	Lew. 1600	0.15	4
	Sep. C18	0.24	13
T-amil alcohol	Duo.	0	0
	Lew. 1600	0.17	9
	Sep. C18	0.4	13

**Tabla 3.1.-** Actividad inicial y selectividad de RML en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y medio totalmente anhidro. La actividad inicial se expresa como micro moles de etil ester de PUFA (EEEEPA+EEDHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ester de ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

En el caso de TLL como se puede ver en la tabla 3.2 el mejor resultado corresponde con la inmovilización hidrofóbica en Sepabeads C18. En ambos disolventes la actividad es mayor para Sepabeads C18 y próxima a 2.24 UI/min, mientras que la selectividad EE-EPA/EE-DHA es superior en presencia de ciclohexano para dicho soporte obteniendo un valor de 29, siendo éste el mejor catalizador obtenido para todas las condiciones estudiadas tanto en actividad como selectividad.

Solvente	Soporte	Actividad inicial (UI/min)	Selectividad
Ciclohexano	Duo.	0.45	12
	Lew. 1600	0.77	4
	Sep. C18	2.24	29
T-amil alcohol	Duo.	0.32	21
	Lew. 1600	0.61	2
	Sep. C18	2.38	8

**Tabla 3.2.-** Actividad inicial y selectividad de TLL en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y medio totalmente anhidro. La actividad inicial se expresa como micro moles de etil ester de PUFA (EEEEPA+EEDHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ester de ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

Para la Lecitasa como se puede ver en la tabla (3.3) ya sólo probamos el soporte Duolite, ya que para la misma estrategia de inmovilización por absorción hidrofóbica el mejor soporte en los anteriores casos había resultado ser el Sepabeads C18 y no se había conseguido mejorar ninguna de las características perseguidas por el estudio con el Lewatit 1600. El mejor resultado correspondió a la inmovilización hidrofóbica en Sepabeads C18. En ambos disolventes la actividad es ligeramente mayor para

Sepabeads C18, mientras que la selectividad EE-EPA/EE-DHA es superior en presencia de T-amil alcohol para dicho soporte obteniendo una valor de 20.5.

Solvente	Soporte	Actividad inicial (UI/min)	Selectividad EE-EPA/EE-DHA
Ciclohexano	Duo.	0.01	-
	Sep. C18	0.04	17.7
T-amil alcohol	Duo.	0.03	12.3
	Sep. C18	0.11	20.5

**Tabla 3.3.-** Actividad inicial y selectividad de la Lecitasa en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y medio totalmente anhidro. La actividad inicial se expresa como micro moles de etil esteres de PUFA (EE-EPA+EE-DHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de esteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

Analizando los resultados, podemos decir, que en ambos disolventes cuando las lipasas se encuentran inmovilizadas iónicamente, éstas exponen su centro activo en contacto directo con el medio, de forma que las propiedades enzimáticas se ven afectadas negativamente si las comparamos con la otra estrategia de inmovilización en la que el centro activo queda protegido. Los otros dos catalizadores aun siendo la misma estrategia de inmovilización, adsorción hidrofóbica, presentan grandes diferencias, siendo más satisfactorios los resultados para Sepabeads C18 que Lewatit. 1600. Esta diferencia entre ambos soportes se puede deber a la diferencia en la naturaleza hidrofóbica de ambos.

Con los resultados obtenidos podríamos concluir que variando la estrategia de inmovilización y la naturaleza del soporte para una misma estrategia podemos modular significativamente la selectividad de una misma lipasa.

### 3.3.- Efecto de la modificación fisico-química de la superficie del catalizador para la etanolisis de aceite de sardina.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio nos han permitido modelar la selectividad de las lipasas utilizando técnicas de post-inmovilización, como es la modificación físico-química de la superficie del catalizador inmovilizado. Dichas modificaciones se realizaron a los mejores derivados obtenidos en los apartados anteriores: RML inmovilizada en Sepabeads C18 en presencia de t-amil alcohol, TLL inmovilizada en Sepabeads C18 en presencia de ciclohexano y Lecitasa inmovilizada en Sepabeads C18 en presencia de t-amil alcohol para intentar mejorar sus propiedades. Las modificaciones que se llevaron a cabo fueron succinilación, aminación, el recubrimiento de los catalizadores con el polímero PEI y con dextrano

después de aminorar en el caso de RML y TLL y sólo el recubrimiento con PEI en el caso de la Lecitasa.

En el caso de RML, como se puede ver en la tabla (3.4) la modificación físico-química del derivado Sepabeads C18 mejora significativamente la selectividad en todos los casos desde un 13 hasta incluso un valor de 27 en el caso de la introducción de cargas negativas en la superficie enzimática (sucinilación). En cuanto a la actividad se mejora ligeramente al recubrir con PEI y hasta un valor de 0.55 UI/min al aminorarla y recubrirla con dextrano.

Modificación	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad EEPA/EEDHA
<b>Sin modificar</b>	0.40	13
<b>Recubierto con PEI</b>	0.46	23
<b>Sucinilación</b>	0.23	27
<b>Aminación</b>	0.22	22
<b>Recubierto con Dextrano</b>	0.55	20

**Tabla 3.4.-** Actividad inicial y selectividad de RML en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y t-amil alcohol.

En el caso de TLL como se puede ver en la tabla (3.5) se obtienen actividades iniciales y valores de selectividad próximos a los de partida excepto para el caso en el que se lleva a cabo la aminación, con dicha modificación disminuyen ambos parámetros, aunque se recuperan al recubrirlo posteriormente con dextrano. En cuanto a la selectividad el mejor resultado es el obtenido antes de modificar.

Modificación	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad
<b>Sin modificar</b>	2.24	29
<b>Recubierto con PEI</b>	2.98	20
<b>Sucinilación</b>	2.43	26
<b>Aminación</b>	0.47	8
<b>Recubierto con Dextrano</b>	2.74	19

**Tabla 3.5.-** Actividad inicial y selectividad de TLL en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y ciclohexano.

Como se puede ver en la tabla 3.6, para Sepabeads-Lecitasa, el efecto de la modificación de la superficie del catalizador no obtuvo buenos resultados.



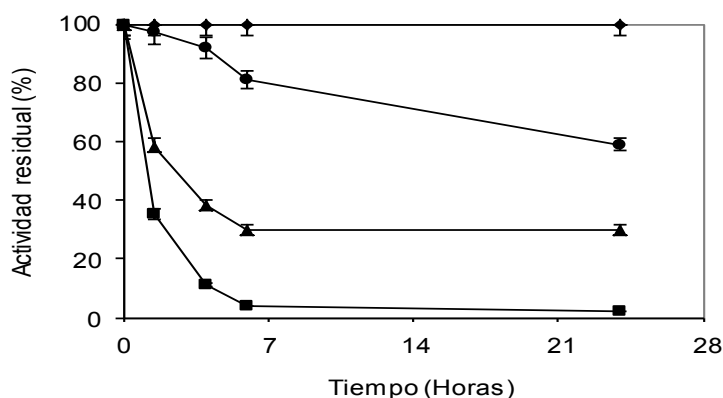
Modificación	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad
Sin modificar	0.11	20.5
Recubierto con PEI	0.07	11.2

**Tabla 3.6.-** Actividad inicial y selectividad de la Lecitasa en la etanolisis de aceite de sardina a 25°C, relación 1/10 aceite/etanol y ciclohexano como medio totalmente anhidro.

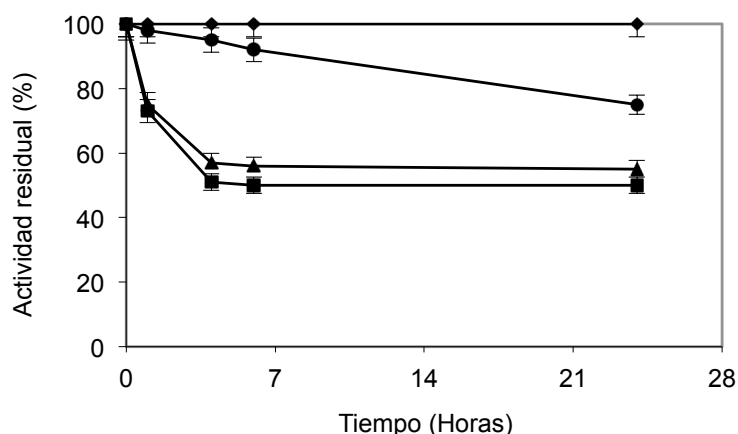
### 3.3.1.- Estabilidad térmica de los catalizadores modificados físico-químicamente en la etanolisis de aceite de pescado.

Además de ver cómo se puede modular la actividad y selectividad de una lipasa en presencia de diferentes solventes orgánicos, mediante distintas estrategias de inmovilización o al modificarlos físico-químicamente, estudiamos también la estabilidad de los catalizadores optimizados en las condiciones de reacción para la etanolisis, presencia de disolventes, medios anhidros y presencia de etanol, que son condiciones bastante drásticas para las enzimas para tener una idea de su posible aplicación a nivel industrial.

Como se puede ver en las imágenes (3.1, 3.2 y 3.3) comprobamos como con la modificación mediante recubrimiento con un polímero catiónico como es la PEI conseguimos aumentar la estabilidad del catalizador. En el caso de RML después de 24 h de incubación del catalizador a 45°, en el caso del derivado modificado se mantiene el 100% de su actividad mientras que el no modificado pierde un 40% de su actividad en las mismas condiciones de reacción, en el caso de TLL pasamos de un 80% a un 100% de actividad residual a las 24 horas a 45°C y en el caso de la Lecitasa pasamos de un 20% a un 85%. Los catalizadores modificados mediante el resto de estrategias resultan menos estables que el catalizador sin modificar.

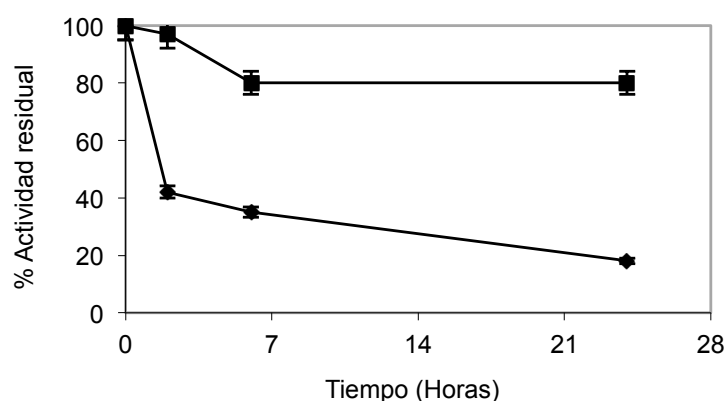


**Imagen 3.1.-** Inactivación térmica en t-amil alcohol a 45°C de los catalizadores modificados de RML Sepabeads C18. Recubierto con PEI (rombos), sin modificar (círculos), aminado y recubierto por dextrano (triángulos), y sucinilados (cuadrados).\*



**Imagen 3.2.**-Inactivación térmica en ciclohexano a 45°C de los catalizadores modificados de TLL Sepabeads C18. Recubierto con PEI (rombos), sin modificar (círculos), aminado y recubierto por dextrano (triángulos), y sucinilados (cuadrados).\*

\*No se representan los valores de estabilidad de los derivados modificados mediante aminación porque caen a 0 en tiempos muy cortos.

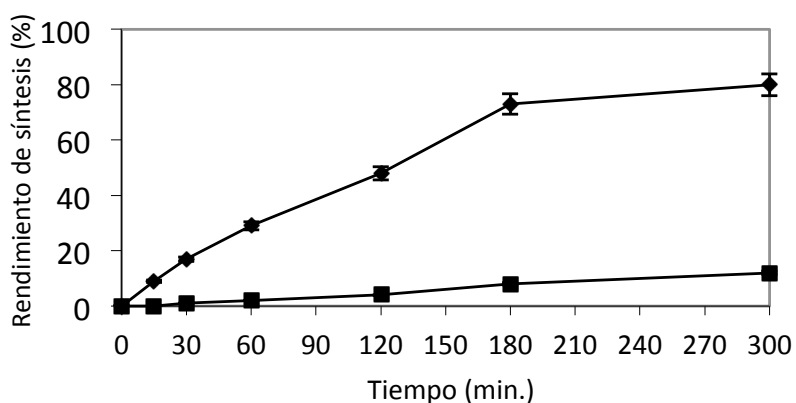


**Imagen 3.3.**-Inactivación térmica en t-amil alcohol a 25°C de los catalizadores modificados de Lecitasa Sepabeads C18. Recubierto con PEI (rombos), sin modificar (círculos).

Con estos resultados se pone de manifiesto que somos capaces de mejorar las propiedades catalíticas de un derivado mediante una modificación físico-química posterior a la inmovilización. A parte de poder incrementar la actividad inicial y selectividad hemos podido aumentar la estabilidad incluso bajo unas condiciones más acusadas de reacción (45°C), esta propiedad es crucial a la hora de utilizar un biocatalizador a nivel industrial, ya que nos facilita poder utilizarlo durante mucho tiempo y reutilizarlo durante varios ciclos sin perder su rendimiento inicial. El hecho de que aumente la estabilidad al recubrir la superficie del catalizador con un polímero catiónico, puede ser, a que además de ya estar protegido en parte el centro catalítico debido al tipo de unión al soporte podamos proteger toda la estructura enzimática del

medio de reacción, haciendo que el disolvente no dañe su estructura ni repercuta en su actividad.

A continuación muestro el transcurso de la reacción de etanolisis para el mejor catalizador obtenido en cuanto actividad/selectividad/estabilidad, que fue TLL inmovilizada en Sepabeads C18 y recubierto por PEI en presencia de ciclohexano. Como se puede ver en la imagen (3.4) hasta las tres horas de reacción el rendimiento de síntesis es muy bueno, ya que la etanolisis se produce fundamentalmente sobre el EPA, en torno al 75% de lo que partíamos, frente a un 5% de etanolisis del DHA total. A partir de ese punto, que la etanolisis del EPA ya es muy elevada, empieza a darse la del DHA disminuyendo la selectividad EE-EPA/EE-DHA.



**Imagen 3.4:** Transcurso en el tiempo de etanolisis de aceite de pescado en ciclohexano catalizada por TLL adsorbida sobre Sep. C18 y recubierto por PEI. EE-EPA rombos, EE-DHA cuadrados.

Con esto vemos que en sólo tres horas ya somos capaces de obtener un buen rendimiento de síntesis (75%) sin una cantidad importante en el medio de DHA. Si lo unimos con la alta estabilidad que hemos visto a 45°C podemos deducir que vamos a poder usar el mismo catalizador con el 100% de actividad durante bastantes ciclos consecutivos debido a que era completamente estable durante 24 horas a 45°C y nuestra reacción la llevamos a cabo a 25°C, en la que la enzima es mucho más estable.

### 3.4.- Conclusión/Discusión.

Podemos concluir que las cuatro lipasas estudiadas, inmovilizadas en un mismo soporte, mostraron diferentes propiedades catalíticas para la etanolisis del aceite de pescado. Para una misma lipasa también obtuvimos diferencias catalíticas cuando se varió el solvente utilizado en la reacción (alcohol ter-amílico o ciclohexano), el tipo de inmovilización o el soporte utilizado. Tanto para derivados obtenidos mediante distintas

estrategias de inmovilización, como para derivados obtenidos mediante la misma estrategia de inmovilización, adsorción hidrofóbica, pero con diferente tipo de soporte obtuvimos unos resultados diferentes en cuanto a actividad inicial y selectividad.

CALB fue la lipasa con la que se obtuvieron unos rendimientos menores de actividad y selectividad en todos los casos y no se pudieron modular mucho sus propiedades con los cambios efectuados. Con RML inmovilizada en Sepabeads C18 logramos obtener para ambos solventes la mejor selectividad que se correspondió con un valor de 13, y al utilizar t-amil como disolvente la actividad dobló su valor hasta 0.4 UI/min. En el caso de TLL para los dos solventes con la inmovilización en Sepabeads C18 se consiguió incrementar la actividad hasta valores en torno a 2.2 UI/min, en cuanto a la selectividad el mejor derivado fue de nuevo Sepabeads C18, esta vez en presencia de ciclohexano, alcanzando un valor de 29. En el caso de la Lecitasa en ambos solventes la actividad resultó ser bastante baja, la selectividad fue mejor en presencia de t-amil alcohol llegando hasta un valor de 20.5.

Viendo estos resultados podemos deducir que las lipasas TLL, Lecitasa y RML son más apropiadas que CALB para la etanolisis de aceite de pescado en presencia de disolventes orgánicos. Dichas lipasas aumentan su actividad cuando se encuentran inmovilizadas hidrofóticamente respecto a la unión aniónica en ambos solventes, sobre todo en el caso del soporte Sepabeads C18. Esto se puede explicar debido a que dicha inmovilización crea un micro entorno alrededor del centro activo que protege a la lipasa del daño que pueda causar el solvente en la zona catalítica, sin embargo en el caso de la inmovilización aniónica queda totalmente expuesto y esto puede verse reflejado en un descenso de la actividad. Lo mismo ocurre para la selectividad de RML y Lecitasa en ambos solventes, la inmovilización hidrofóbica la favorece, sobre todo Sepabeads C18. Para TLL sin embargo la selectividad no sigue una norma, depende de cada soporte y solvente, aun así el mejor resultado volvió a corresponder a Sepabeads C18, en este caso en presencia de ciclohexano, alcanzándose el mayor valor de selectividad de todas las condiciones estudiadas, que fue de 29.

La modificación físico-química de los mejores derivados obtenidos en los análisis anteriores, nos permitió en algunos casos mejorar las actividades iniciales, y en el caso de RML incrementar con todas las modificaciones la selectividad, de un valor de 13 a un valor en torno a 20. Además, con la modificación conseguimos, como podemos ver al estudiar los catalizadores en cuanto a su estabilidad, que el revestimiento con PEI de los derivados Sepabeads C18 mejoró en gran medida la estabilidad de RML en alcohol terc-amílico y de TLL en ciclohexano a 45°C, pasando

de unos valores de actividad residual a las 24 horas del 60% y 80% con RML y TLL respectivamente, a un 100% en ambos casos con el recubrimiento con PEI, lo mismo sucede para la Lecitasa en alcohol terc-amílico a 25°C donde se pasa de una actividad residual a las 24 horas del 20% al 85%. Para las demás modificaciones, aunque en algunos casos se consigue aumentar la actividad y selectividad, la estabilidad resulta menor que el derivado sin modificar. Una forma de explicar este fenómeno puede ser que al modificar químicamente no haya un número suficiente de grupos para modificar o los grupos modificados no se encuentren en regiones estratégicas para la estabilidad enzimática, mientras que con la modificación con PEI se recubre totalmente el catalizador quedando la proteína protegida en toda su estructura. Con el dextrano también se recubre toda la estructura pero este polímero tiene cargas negativas que en vez de proteger frente al solvente como ocurre con la PEI puede atraerlo y hacer que se produzca un mayor contacto con el solvente, o que éste polímero sea menos resistente al contacto con este tipo de solventes.

Con todo lo mencionado anteriormente para la etanolisis de aceite de pescado, teniendo en cuenta las variables estudiadas, el mejor catalizador en cuanto a actividad-selectividad-estabilidad fue TLL adsorbido sobre el soporte hidrofóbico Sepabeads C18, recubierto con PEI y en presencia de ciclohexano. Se obtuvieron unos valores de 2.24 UI/min de actividad inicial, 20 de selectividad EEPA/EEDHA y un 100% de actividad residual a 45°C a las 24 horas en cuanto a estabilidad teniendo en cuenta que la reacción de etanolisis finaliza en 5h.

Como se ha visto, la etanolisis catalizada de forma enzimática con lipasas puede realizarse bajo unas condiciones suaves de reacción (25°C), que no dañan a los ácidos grasos omega-3 como puede ocurrir con métodos químicos en los que se utilizan altas temperaturas. Además se obtiene un rendimiento alto de EEPA (75%) en tiempos cortos de reacción (3 horas) y con un bajo contenido de EEDHA, pudiendo ser utilizado el catalizador por mucho tiempo sin perder su actividad inicial debido a su alta estabilidad. Con todo esto se pone de manifiesto que el uso de biocatalizadores es una opción muy factible a la hora de su posible aplicación en la industria.

## **4.- Etanolisis de aceite de pescado catalizada por lipasas en ausencia de solventes.**

Una alternativa al proceso de etanolisis ya estudiado, aunque la solubilidad de los sustratos puede ser mejor con la utilización de solventes orgánicos como medio de reacción, es prescindir de dichos solventes ya que el uso solamente de aceite y etanol es más común para su uso en tecnología de alimentos por tratarse de medios de reacción más adecuados (reacción ya descrita en la figura 3). A la vista de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, elegimos la lipasa de TLL y lecitasa para hacer el estudio de la etanolisis de aceite de sardina en ausencia de disolventes, ya que fueron las lipasas con las que obtuvimos mejores resultados. La reacción transcurrió en un entorno totalmente anhidro para que no se pudiera dar ningún fenómeno de hidrólisis. Las condiciones de reacción fueron de nuevo suaves, 25°C, y una agitación orbital de 150 rpm, y se utilizó una relación molar mayor de etanol que de aceite (1/10) para que pudiesen reaccionar todo el aceite.

Se estudió la actividad y selectividad sin solventes para diferentes catalizadores de las lipasas comparándolos con los mejores datos obtenidos para estas lipasas en presencia de solventes.

### **4.1.- Estudio de diferentes estrategias de inmovilización en la etanolisis de aceite de pescado en ausencia de solventes orgánicos.**

El estudio de la influencia de la estrategia de inmovilización sobre las propiedades catalíticas de las lipasas en la etanolisis de aceite que se realizó en el capítulo anterior en presencia de disolvente, lo realizamos ahora en ausencia para comprobar si en estas nuevas condiciones tanto la actividad como la selectividad se podrían también modular. Para ello se volvieron a inmovilizar TLL y Lecitasa en Sepabeads C18 y Duolite, además llevamos a cabo la modificación físico-química post-inmovilización con PEI y también se estudió el comportamiento de un catalizador comercial de TLL (TLL IM de Novozymes) ya que suele utilizarse mucho en este tipo de reacciones.

En el caso de TLL la actividad inicial como se puede ver en la tabla 4, en ausencia de disolvente disminuye para todos los catalizadores excepto para Sepabeads C18 que aumenta hasta 4.4 veces, pasando de 2.24 UI/min a 9.96 UI/min. En el caso de la selectividad los mejores valores corresponden cuando en el medio de reacción hay ciclohexano (29), cuando no hay solvente en el medio el mejor resultado corresponde a Sepabeads C18 llegando a un valor de 14. Con estos resultados vemos que en

ausencia de solventes no logramos aumentar la selectividad del catalizador pero sí la actividad inicial en uno de los casos hasta 4.4 veces.

Condición	Soporte	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad EEEEPA/EEDHA
Sin Solvente	Sepabeads C18	9.96	14
	Sepabeads C18 + PEI	0.03	9
	Duolite	0.004	12
	Comercial TL IM	0.01	3

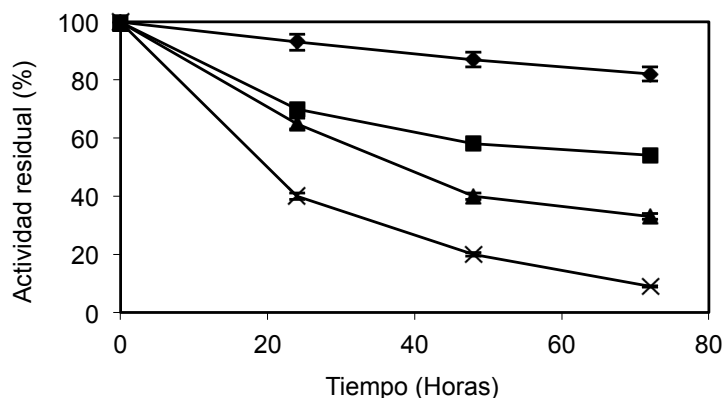
**Tabla 4.-** Actividad inicial y selectividad de TLL en la etanolisis de aceite de pescado a 25°C usando como catalizador TLL inmovilizado en diferentes soportes, en ausencia/presencia de disolvente. La actividad inicial vuelve a expresarse como micro moles de etil ester de PUFA (EPA+DHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ester de etilicos de los ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

Para la Lecitasa la actividad inicial como se puede ver en la Tabla (4.1), en ausencia de disolvente disminuye para todos los catalizadores. Pero si nos fijamos en la selectividad el mejor valor corresponde cuando en el medio de reacción no se usan solventes llegando a un valor de 42.6 en el caso de Sepabeads C18, dicho valor es el más alto obtenido hasta entonces en este tipo de reacciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

Condición	Soporte	Actividad Inicial (UI/min)	Selectividad EEEEPA/EEDHA
Sin Solvente	Sepabeads C18	0.010	42.6
	Sepabeads C18 + PEI	0.0005	2
	Duolite	0.001	8

**Tabla 4.1.-** Actividad inicial y selectividad de Lecitasa en la etanolisis de aceite de pescado a 25°C usando como catalizador Lecitasa inmovilizado en diferentes soportes, en ausencia/presencia de disolvente. La actividad inicial vuelve a expresarse como micro moles de etil ester de PUFA (EPA+DHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ester de etilicos de los ácidos grasos (FAEE) y la selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

Una vez vistos los resultados de actividad inicial y selectividad pasamos a estudiar la estabilidad de los derivados durante tres días de incubación a 25°C para ver si eran estables durante un tiempo largo de incubación en el medio de reacción. Como se puede ver en la figura 4, la estabilidad de los derivados de TLL cambia completamente dependiendo de la estrategia de inmovilización empleada. Destacando que el derivado comercial (TLL IM) es el menos estable de todos los catalizadores estudiados, a las 72h sólo mantiene un 9% de actividad residual mientras que TLL-Sepabeads C18 aún un 82%.



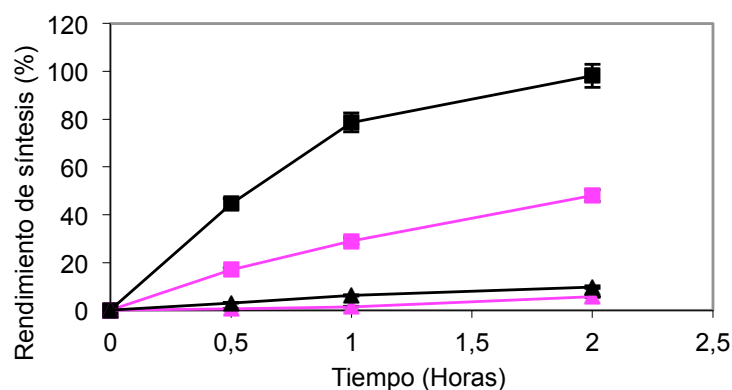
**Figura 4.-**Estabilidad de diferentes derivados de TLL en aceite de sardina a 25°C. Sepabeads C18 (rombos), Sepabeads C18 modificado con PEI (cuadrados), Duolite (triángulos), y Comercial TLL IM (aspas).

También se estudió la estabilidad de la Lecitasa, permaneciendo durante cinco días la actividad residual al 100% en el caso del Sepabeads C18, el cual era el que mejor resultado en selectividad nos daba.

#### 4.2.- Curso de la reacción de etanolisis de aceite de pescado catalizada por TLL-Sepabeads C18.

Una vez estudiada la optimización de la reacción en cuanto a actividad, selectividad y estabilidad del catalizador, el siguiente paso fue estudiar el curso de reacción en las condiciones óptimas. En el caso de trabajar en ausencia de disolventes fue la inmovilización en Sepabeads C18. En cuanto al rendimiento de síntesis se obtienen mejores resultados cuando no usamos disolvente como se recoge en la figura (4.1). A las dos horas de la reacción ya hay un 98% de EEPA mientras que con disolvente sólo un 48%. Las diferencias en cuanto a velocidad son normales ya que lo vemos reflejado en el valor de actividad que tenemos, pasamos de 2.24 UI/min en presencia de solventes a 9.96 UI/min en ausencia, pero ni aun dejándolo más tiempo llegábamos a unos rendimientos tan altos de EEPA en presencia de ciclohexano como vimos en el anterior capítulo de resultados, por lo que éste método además de acelerar la reacción nos permite obtener un mayor rendimiento de EEPA sin grandes cantidades en el medio de EEDHA (sólo un 9.6%).





**Figura 4.1.-** Selectividad EEPA-EEDHA en la etanolisis de aceite de pescado. Se representa rendimiento de síntesis con el tiempo. Temperatura de 25°C usando como catalizador TLL inmovilizado en Sep. C18. Se representa con cuadrados EE-EPA y triángulos EE-DHA, en ausencia (negro)/ presencia de disolvente (rosa).

#### 4.3.- Estudio comparativo de la estabilidad de Sepabeads-TLL en ausencia y presencia de disolvente en la etanolisis de aceite de sardina.

Pasamos a hacer un estudio comparativo de estabilidad para Sepabeads-TLL en ausencia y presencia de ciclohexano, el estudio lo realizamos incubando el catalizador en las condiciones de reacción para la etanolisis de aceite durante tres días, y comparamos la actividad, selectividad y rendimiento de síntesis para el catalizador antes y después de la incubación. Después de tres días la lipasa presenta casi toda su actividad en el medio sin solvente, mientras que en presencia de ciclohexano ha caído tres veces (0.74), tabla 4.2.

Condición	Actividad T=0.	Actividad T=3días.
Ciclohexano	2.24	0.74
Sin Solvente	9.96	9.05

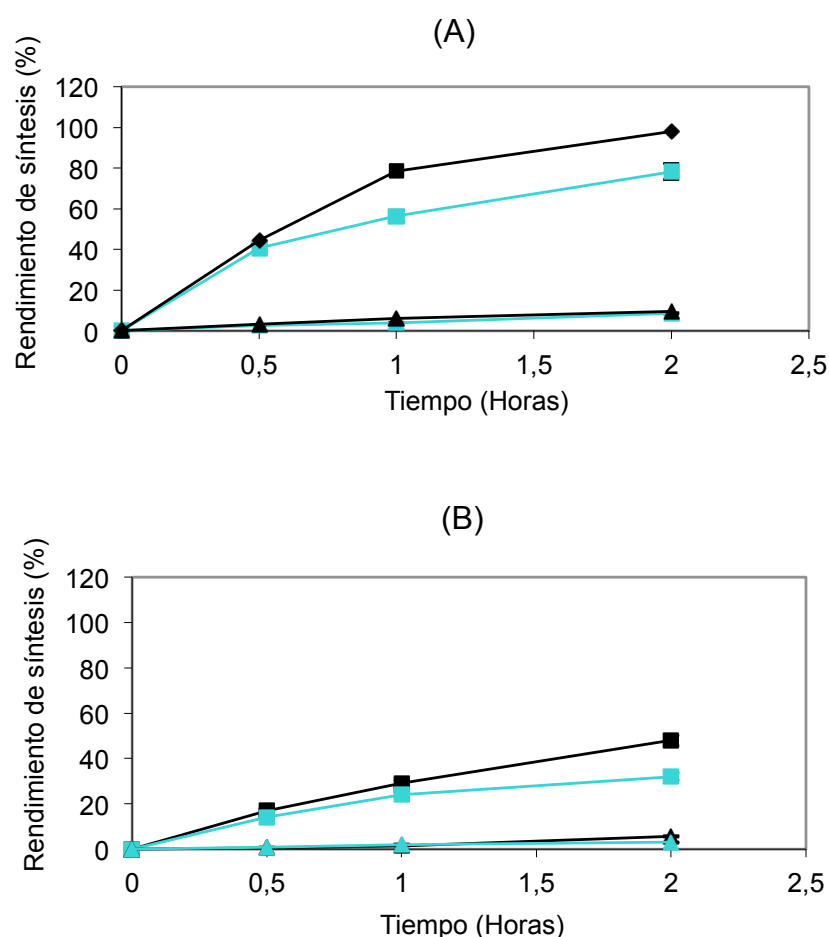
**Tabla 4.2.-** Actividad inicial de TLL inmovilizada en Sepabeads C18 en la etanolisis de aceite de pescado a 25°C, comparando el estado inicial con tres días de incubación en la correspondiente condición. La actividad inicial vuelve a expresarse como micro moles de etil ésteres de PUFA (EPA+DHA) sintetizados por minuto y por miligramo de lipasa inmovilizada cuando se ha producido una conversión del 10% de ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEE).

Tras este periodo de tiempo ocurre algo similar con la selectividad, como se ve en la tabla 4.3, pasa de 29 a un valor de 17 con ciclohexano mientras que en ausencia de disolvente no se ve afectada. Aunque sigue siendo mayor la selectividad con ciclohexano, no cae en ausencia de disolvente. Con estos resultados podemos decir que la presencia o no de disolvente afecta a la estabilidad en cuanto a condiciones de actividad y selectividad del catalizador TLL-Sepabeads C18.

Condición	Selectividad EEEEPA/EEDHA T=0.	Selectividad EEEEPA/EEDHA T=3días.
Ciclohexano	29	17
Sin Solvente	14	15

**Tabla 4.3.-** Selectividad de TLL inmovilizada en Sepabeads C18 en la etanolisis de aceite de pescado a 25°C, comparando el estado inicial con tres días de incubación en la correspondiente condición. La selectividad se expresa como relación molar entre la síntesis de EE-EPA y EE-DHA.

El rendimiento de síntesis en cuanto a estabilidad a los tres días, vemos en la figura 4.2 que a las dos horas de reacción cae a un 78% sin solvente (frente al 98% de partida) y a un 32% con solvente (frente al 48% de partida). El rendimiento de síntesis sigue siendo mejor para la reacción sin disolvente y como era de esperar si comparamos con el rendimiento inicial vemos que la estabilidad es mejor para el catalizador sin disolvente ya que ha caído un 20% frente al 33% que hemos perdido al usar el disolvente.

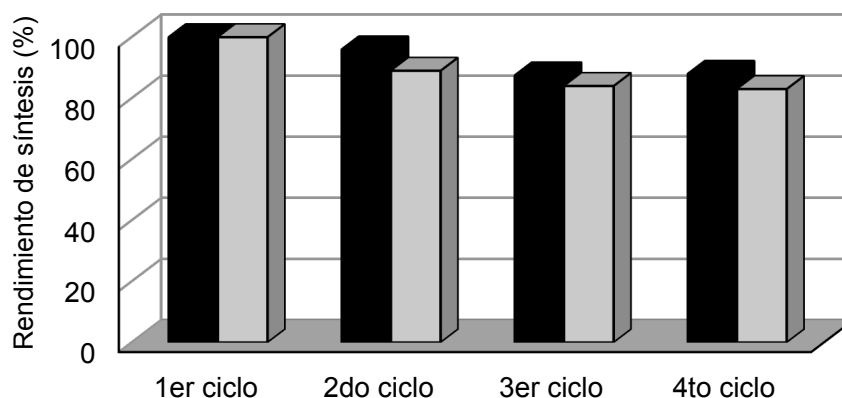


**Figura 4.2.-** Selectividad EEEPA-EEDHA en la etanolisis de aceite de pescado en ausencia (A) o presencia (B) de solvente. Se representa rendimiento de síntesis con el tiempo. Temperatura de 25°C usando como catalizador TLL inmovilizado en Sep. C18. Se representa con cuadrados EE-EPA y triángulos EE-DHA, a tiempos iniciales (negro)/ y después de tres días de incubación (azul).

Por lo que podemos destacar que para todas las variables estudiadas el catalizador TLL-Sepabeads C18 es más estable en ausencia que en presencia de ciclohexano. En ambos casos se forma principalmente EEPA, siendo despreciable la cantidad formada de EEDHA respecto al total de ésteres de PUFAS formados, por lo que ambos métodos son muy adecuados a la hora de un proceso industrial sin tener que realizar complicados métodos de purificación posteriores.

#### 4.4.- Ciclos de reacción de la etanolisis de aceite de pescado, catalizado con TLL-Sepabeads C18.

Como se puede ver en la figura 4.3 la actividad residual de los catalizadores en ausencia y presencia de ciclohexano permanece por encima del 80 % tras cuatro ciclos de reacción.



**Figura 4.3.-** Estabilidad en la reacción de etanolisis de aceite de pescado a 25°C usando como catalizador TLL inmovilizado en Sep. C18 en ausencia (gris)/presencia (negro) de disolvente analizando lo que ocurre durante cuatro ciclos de reacción.

#### 4.5.- Conclusión/Discusión.

Se puede concluir que en ausencia de disolvente para la etanolisis de aceite de pescado TLL es más activa, selectiva y estable cuando la inmovilizamos en Sepabeads C18, mientras que con el derivado comercial obtenemos los peores valores para las tres variables estudiadas. Que con la Lecitasa obtenemos valores muy bajos de actividad pero sin embargo en ausencia de solvente somos capaces de obtener una selectividad hacia EEPA de 42.6, el más alto obtenido hasta el momento, además nos permite obtener un EE-EPA con un rendimiento superior al 90% a tiempos finales.

Que si comparamos TLL-Sepabeads C18 en ausencia y presencia de ciclohexano, en ausencia de disolvente es más activo y obtenemos un mayor rendimiento de síntesis

total pero es menos selectivo. Al estudiar la estabilidad después de tres días de incubación en el medio de reacción, vemos que TLL-Sepabeads C18 es más estable cuando no utilizamos disolvente ya que tanto la actividad como selectividad permanece estable y cuando usamos ciclohexano cae 3 y 1.7 veces respectivamente, en cuanto al rendimiento de síntesis cae en los dos casos pero es más acusada en la reacción en la que usamos disolvente (33%).

Aun así no se observan diferencias en cuanto a la obtención de EEPA respecto el total de PUFAS por lo que ambos métodos son muy adecuados a la hora de obtener mayoritariamente uno de los ésteres de interés, y la actividad residual de ambos catalizadores, tras cuatro ciclos de reacción permanece por encima del 80%.

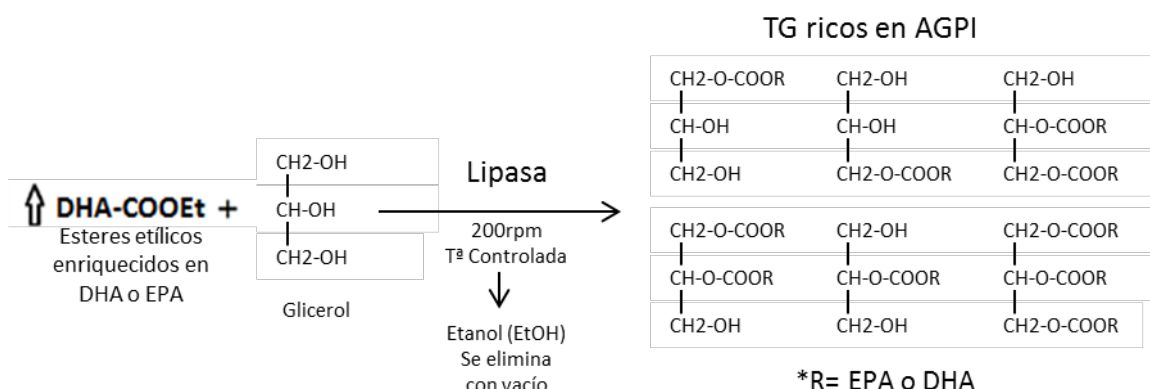
Con todo esto podemos concluir que el uso de este tipo de reacción en ausencia de solventes puede llevarse a cabo ya que se obtienen unos rendimientos de síntesis muy altos en tiempos aún más cortos que cuando usábamos solventes, que hemos sido capaces de conseguir un valor de selectividad muy elevado usando Sepabeads-Lecitasa y un catalizador muy estable pudiendo realizar un gran número de ciclos con rendimientos aceptables en el caso de Sepabeads-TLL.

## 5.- Lípidos estructurados.

### 5.1.- Obtención de triglicéridos de $\omega 3$ . Interesterificación de glicerol con ésteres etílicos de DHA (EEDHA).

Como ya se ha comentado, el contenido en PUFAS de los aceites que se encuentran en los alimentos como el pescado azul es elevado, pero solo representan entre el 18-25 % del total de las grasas presentes. Para enriquecer los alimentos en PUFAS lo que se persigue es la purificación y concentración de EPA y DHA en forma de ácidos y ésteres como se ha mostrado en los apartados anteriores. Los ácidos grasos y triglicéridos se metabolizan completamente y de forma más rápida que los ésteres, además los AG se oxidan más fácilmente. Por ello la forma que se considera más adecuada para su ingestión es como TG. En este apartado estudiamos la formación de TG ricos en DHA gracias a la transesterificación enzimática de EEDHA con glicerol. El EEDHA se obtuvo mediante etanolisis enzimática como se describió en los capítulos 4 y 5 de resultados. Gracias a este proceso podemos obtener TG ricos en un solo tipo de  $\omega 3$  después de obtener y purificar el éster (figura 5).

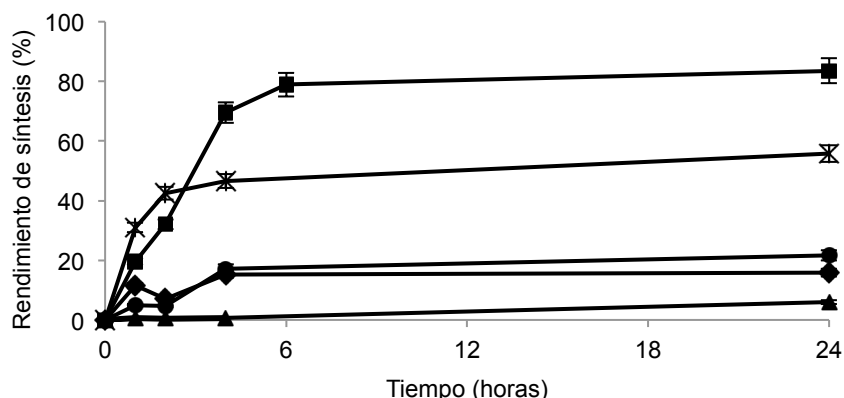
La reacción se llevó a cabo utilizando un exceso de EEDHA y glicerol (relación 3:0.2 moles) para que se pudieran llegar a formar el máximo de TG posibles, se mantuvo en agitación orbital, bajo una temperatura controlada y a vacío para eliminar el etanol que se fuera formando y así evitar la reacción inversa. Estudiamos el porcentaje de formación de los diferentes DHA-glicéridos. Utilizamos como catalizadores cinco lipasas comerciales (PFL, RML, TLL, QL y CALB) adsorbidas sobre el soporte hidrofóbico Sepabeads C18 y también estudiamos el derivado comercial Novozyme 435.



**Figura 5.-** Reacción de transesterificación enzimática de ésteres etílicos de AGPI con glicerol para dar lugar a TG ricos en AGPI.

### 5.1.1.- Perfil de síntesis de triglicéridos con diferentes lipasas inmovilizadas.

Estudiamos el transcurso de la reacción con las diferentes lipasas comentadas al principio del capítulo. Inmovilizamos dichas lipasas por adsorción hidrofóbica a Sepabeads C18. La reacción se llevó a cabo a 50°C. Se obtuvieron unos resultados muy diferentes dependiendo de la empleada. Con tres de las lipasas (TLL, QL y RML) los rendimientos de obtención de TG fueron inferiores al 20%, con PFL fue del 50% y con CALB se obtuvo un rendimiento mayor al 80% (figura 5.1). Con esto vemos que aun siendo lipasas inmovilizadas mediante la misma estrategia en el mismo tipo de soporte su comportamiento es muy diferente en la reacción debido a las propiedades estructurales de sus estructuras proteicas y centros catalíticos. El mejor catalizador correspondió a la inmovilización de CALB (figura 5.1) obteniéndose un 85% de triacil DHA a las 24 horas. Además hay que destacar que la velocidad de formación del triglicérido con CALB es muy rápida, ya que a las 6h prácticamente ya se ha formado todo el producto posible y que además es muy estable, porque después de 24 horas se mantiene el rendimiento de reacción.



**Figura 5.1.-** Síntesis del triglicérido de DHA catalizado por diferentes lipasas inmovilizadas en Sep. C18 y condiciones óptimas.  $T = 50^{\circ}\text{C}$ , 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol. RML (triángulos), QL (círculos), TLL (rombos), PFL (asteriscos) y CALB (cuadrados).

### 5.1.2.- Efecto de la temperatura en la síntesis catalizada por CALB-SepabeadsC18.

Se realizó un estudio de la variación de la temperatura para ver si ésta modificaba el perfil de síntesis de la reacción y como se puede ver en la tabla 5 así fue. Cuando la temperatura de reacción es de 37°C se forma principalmente el monoglicérido en la posición dos, mientras que si subimos la temperatura a un valor de 50°C en vez del

monoglicérido lo que se forma mayoritariamente es el TG, y si aumentamos aún más la temperatura, a 60°C, se obtiene una mezcla de ambos.

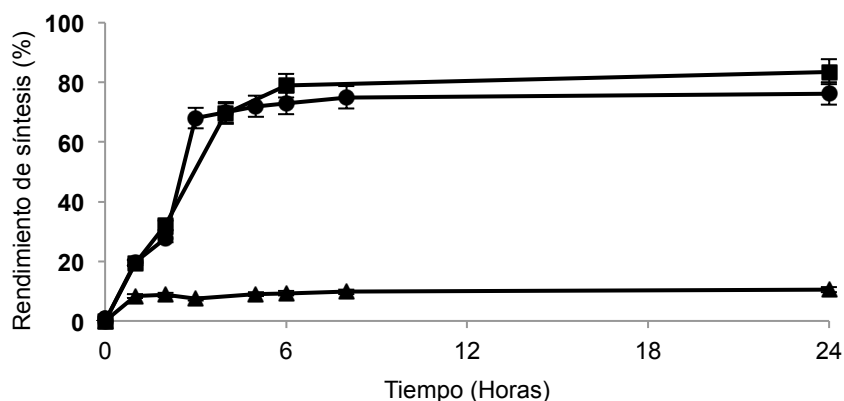
Temperatura (°C)	% Sn2 monoacil DHA	% Triacil DHA
37	90	10
50	15	85
60	40	50

**Tabla 5.-** Síntesis de mono y triacil glicerol a diferentes temperaturas catalizado por CALB inmovilizada en Sep. C18 a diferentes temperaturas, vacío, 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol.

Suponemos que por encima de una cierta temperatura, como ocurre ya a 50°C, desaparece el etanol por completo y no puede dar lugar a la reversión de la reacción hacia los sustratos de partida o los productos intermedios, cosa que a una temperatura inferior de 37°C no ocurriría ya que no seríamos capaces de eliminar del todo el etanol presente en la reacción. En el caso de los 60°C creemos que aún no se ve dicho efecto porque el proceso es más lento debido a que dicha temperatura tan elevada pueda estar influyendo negativamente a la actividad enzimática.

### 5.1.3.- Síntesis del triglicérido de DHA catalizado por CALB inmovilizada en diferentes soportes.

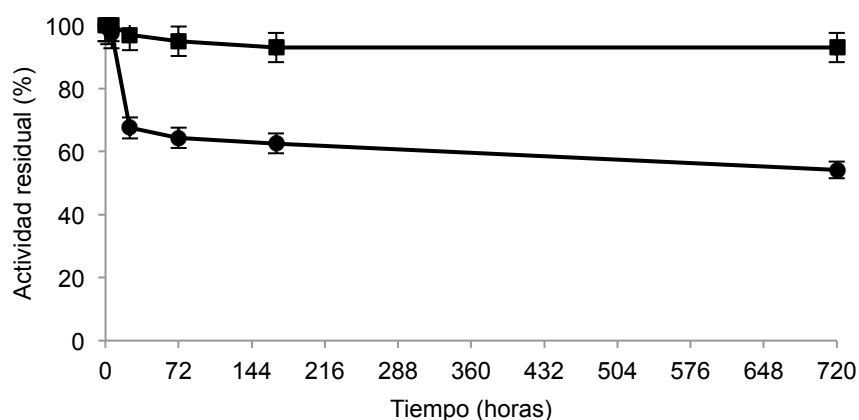
Como el mejor resultado obtenido en el apartado anterior fue con CALB se hizo un estudio de la modulación de las propiedades de CALB en la transesterificación del glicerol con el EEDHA utilizando distintas estrategias de inmovilización. Además del derivado Sepabeads ya utilizado anteriormente, inmovilizamos la lipasa por interacción de tipo iónica al soporte Duolite y también se probó el catalizador comercial Novozyme 435, el cual posee CLAB inmovilizada al soporte de forma hidrofóbica al igual que ocurre con el Sepabeads C18. De nuevo el mejor rendimiento correspondió al soporte Sepabeads C18 como se muestra en la figura 5.2, pero fue ligeramente superior al resultado obtenido con Novozyme 435. Viendo estos resultados se puede contemplar que la estrategia de inmovilización por adsorción hidrofóbica es la más adecuada en este tipo de reacción para la acción de las lipasas, esto se puede deber a que el centro activo queda abierto y protegido por la superficie del soporte previniéndose así la posible interacción deletérea de los residuos catalíticos con el medio totalmente anhidro.



**Figura 5.2.-** Síntesis del triglicérido de DHA catalizado por CALB inmovilizada en diferentes soportes en condiciones óptimas.  $T = 50^{\circ}\text{C}$ , 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol. Duolite (triángulos), Novozyme 435 (círculos) y Sep. C18 (cuadrados).

#### 5.1.4.- Estabilidad térmica de los mejores derivados de CALB en condiciones anhidras.

Aunque los rendimientos de síntesis entre los dos soportes son similares la estabilidad del Sepabeads C18 es mucho mejor ya que a las 720 horas aún mantiene el 95% de actividad residual, mientras que Novozyme 435 sólo presenta el 60% (figura 5.3).



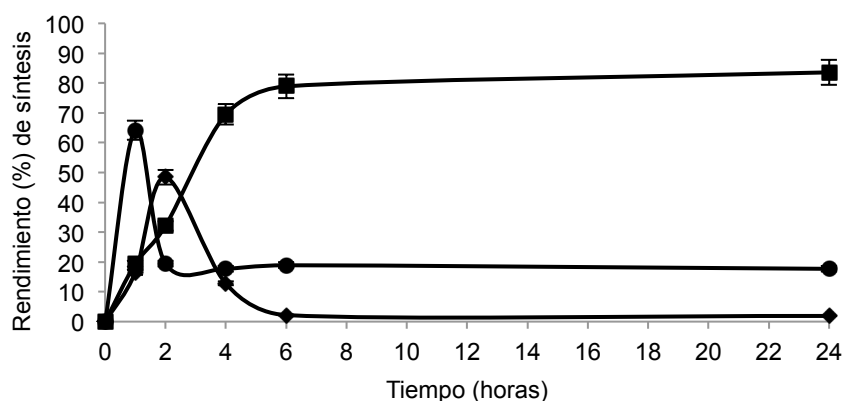
**Figura 5.3.-** Inactivación con el tiempo de los derivados de CALB a  $50^{\circ}\text{C}$  y medio anhidro. Sepabeads (cuadrados) y Novozyme 435 (círculos).

#### 5.1.5.- Perfil de síntesis del triglicérido de DHA catalizado por CALB en las mejores condiciones descritas.

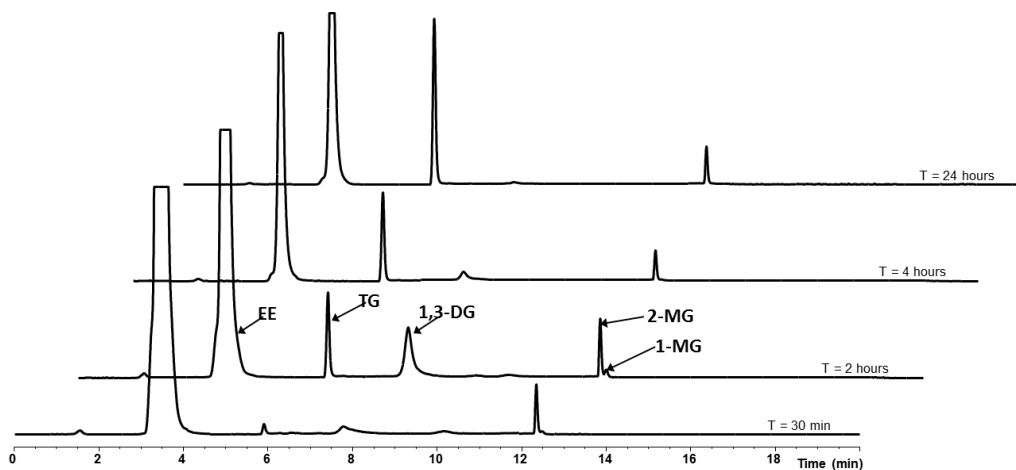
Bajo las condiciones óptimas, el transcurso de la transesterificación sigue un orden lógico. Con el paso del tiempo como se puede observar en la figura 5.4 va desapareciendo el ester etílico y primero se forma monoglicérido, luego aparece el diacilglicerol y finalmente se forma el TG. Al final queda una fracción de sn-2



monoacilglicerol sin reaccionar, quedando mayoritariamente triacilglicerol DHA y una minoría de monoacilglicerol DHA en la posición dos como podemos ver mediante cromatografía de gases (figura 5.5). Los TG son muy fáciles de separar de los monoglicéridos por destilación molecular, por lo que se puede obtener un alto porcentaje de TG puro. Además el subproducto (sn-2 monoacilglicerol de DHA) puede ser un intermediario muy interesante para la síntesis de nuevos derivados de DHA.



**Figura 5.4.-** Perfil de síntesis de los productos formados por el EE-DHA y glicerol catalizado por CALB inmovilizada en Sep. C18 a 50°C, vacío, 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol. monoacilglicerol (círculos), triacilglicerol (cuadrados) y diacilglicerol (rombos).

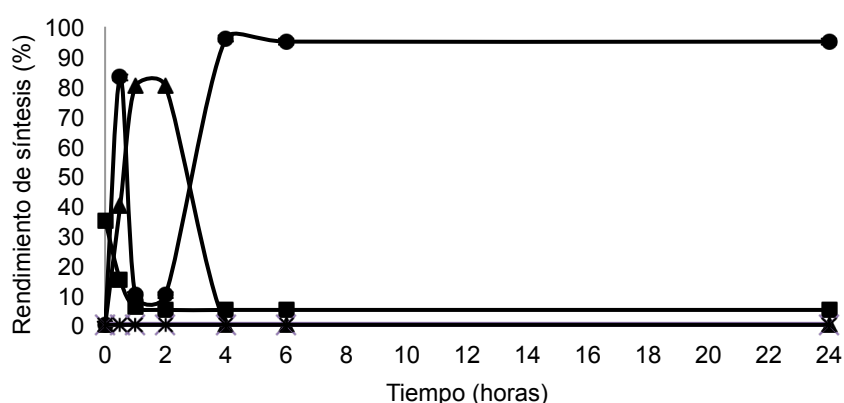


**Figura 5.5.-** Análisis por HPLC-ELSD de la composición de la mezcla de reacción producida en el tiempo por Sep.C18 CALB en las condiciones óptimas de reacción  $T= 50^{\circ}\text{C}$ , 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol.

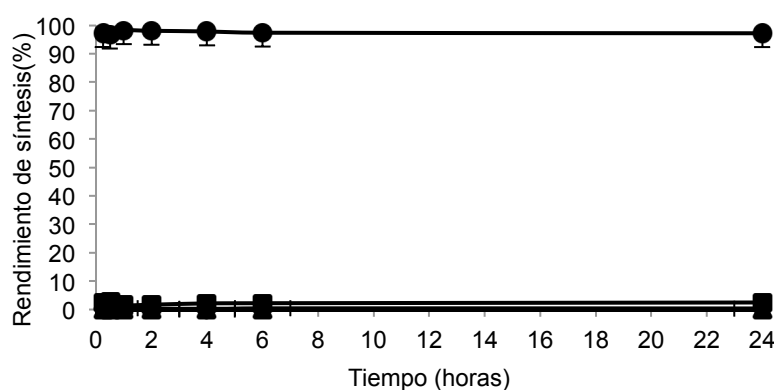
### 5.1.6.- Síntesis enzimática de monoglicérido sn-2 de DHA catalizada por lipasas inmovilizadas.

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente se quiso analizar si éramos capaces de optimizar también el proceso de obtención del monoglicérido sn-2 ya que

al igual que el TG posee interés como ingrediente alimentario. Pudimos comprobar que la transesterificación enzimática del EEDHA con glicerol a 37°C ocurre en muchos casos a través de la formación inicial de sn-2 mono acil glicerol DHA (figuras 5.6 y 5.7). Se llevó a cabo para todas las lipasas señaladas al principio del capítulo pero sólo obtuvimos buenos resultados para las representadas a continuación, RML y CALB. Se obtuvieron unos valores muy altos desde unos tiempos muy cortos de reacción, valores en torno al 98% de monoglicérido a las 4 horas con CALB y con tan sólo 15 minutos en el caso de RML.

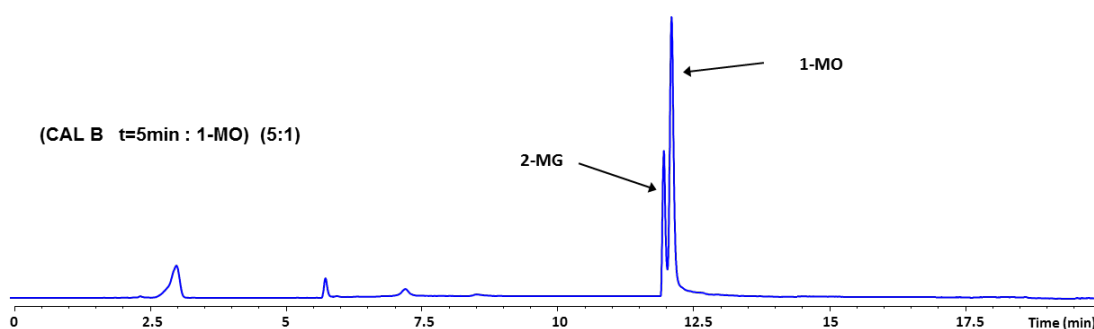


**Figura 5.6.-** Perfil de síntesis de los productos formados por el EE-DHA y glicerol catalizado por CALB inmovilizada en Sep. C18 a 37°C, vacío, 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol. 2-monoacilglicerol (círculos), triacilglicerol (cuadrados), 1-monoacilglicerol (triángulos), 1,2 diacilglicerol (rombos), 1,3 diacilglicerol (asteriscos).



**Figura 5.7.-** Perfil de síntesis de los productos formados por el EEDHA y glicerol catalizado por RML inmovilizada en Sep. C18 a 37°C, vacío, 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol. 2-monoacilglicerol (círculos), triacilglicerol (cuadrados), 1-monoacilglicerol (triángulos), 1,2 y 1,3 diacilglicerol (rombos).

Utilizando cromatografía se chequeo que el monoacil era efectivamente el sn-2 (figura 5.8). Este derivado de DHA podría ser una forma bastante conveniente para ingerir el ácido graso omega 3 con una adecuada biodisponibilidad.



**Figura 5.8.-** Cromatograma perfil de síntesis de 1-mono y 2-monoacil glicerol DHA. Catalizado por CALB inmovilizada en Sep. C18 a 37°C, vacío, 1 g catalizador y [3:0.2] relación molar etil ester: glicerol.

### 5.1.7.- Conclusión/Discusión.

La transesterificación enzimática de EEDHA con glicerol es un proceso complejo que puede llegar a producir unos interesantes productos enriquecidos en PUFAs muy recomendables para su utilización como ingredientes funcionales.

El transcurso de la reacción depende mucho de la lipasa utilizada, la estrategia de inmovilización y de la temperatura empleada. Hemos visto que algunas lipasas a temperaturas bajas como 37°C sintetizan mayoritariamente sn-2 monoacil derivados incluso en presencia de exceso de etil ester. Por ejemplo RML a 37°C llega a producir el 98% de sn-2 monoacil DHA y CALB varía su comportamiento sintético muy notablemente con la temperatura, obteniendo los mejores rendimientos de sn-2 monoacil DHA a 37°C, llegando hasta un 90% del TG. Analizando cromatográficamente los productos de reacción, se comprobó como el monoglicérido obtenido era el de la posición 2, producto de gran interés ya q podría ser una forma bastante conveniente para ingerir el ácido graso omega 3 con una adecuada biodisponibilidad.

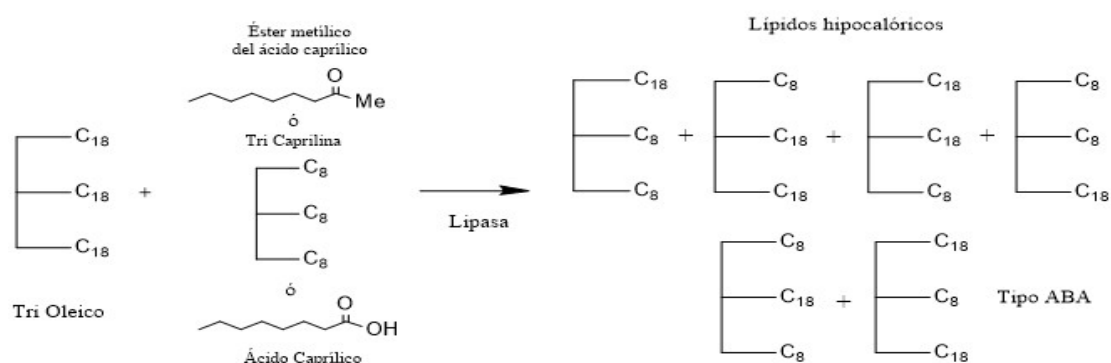
Si aumentamos la temperatura hasta 50°C cambia el perfil de síntesis y se obtiene principalmente triacil glicerol DHA pues quizás a 37°C el etanol no se elimina de la mezcla de reacción a pesar de aplicar vacío en el reactor y la reacción se revierte en parte. En general se obtuvieron bajos rendimientos de triglicéridos y solo con las enzimas de *Candida antarctica* B y de *Pseudomonas fluorescens* se obtuvieron resultados bastante interesantes (rendimientos del 82 y 57 % respectivamente). Se probó a inmovilizar la enzima con la que habíamos obtenidos mejores rendimiento de TG inmovilizada en Sepabeads C18 mediante otras estrategias (iónica en Duolite) y también un derivado comercial (Novozyme 435). Los rendimientos fueron muy diferentes para los diferentes derivados de CALB utilizados siendo mucho más altos

cuando la enzima estaba adsorbida sobre soportes hidrofóbicos. En el mejor de los casos obtenemos un rendimiento de síntesis de TG de DHA del 82% (Sepabeads C18). En este caso sólo queda junto con el TG al final de la reacción sn-2 monoacilglicérido, el cual es un interesante intermediario útil en la industria alimentaria y farmacéutica. Además, el monoglicérido se puede separar fácilmente del producto principal. La estabilidad de los mejores derivados, CALB adsorbida en soportes hidrofóbicos, es realmente buena en el caso del soporte Sepabeads C18, preservándose el 90 % de la actividad después de un mes bajo las condiciones óptimas de reacción mientras que en para el caso del derivado comercial a las 72 horas ya ha caído al 60%. Esto se traduce en que va a ser posible utilizar el mismo derivado durante un gran número de ciclos de reacción, lo cual hace que se rentabilice el proceso.

Por lo que con esta reacción obtenemos enzimáticamente dos productos de un alto valor añadido en la industria alimentaria, dependiendo de las condiciones de reacción que utilicemos. Además no obtenemos productos secundarios indeseados ni utilizamos unas condiciones de reacción agresivas que puedan comprometer las cualidades saludables de nuestros productos.

## 5.2.- Síntesis de lípidos estructurados mediante interesterificación de trioleína con ácidos grasos de cadena media.

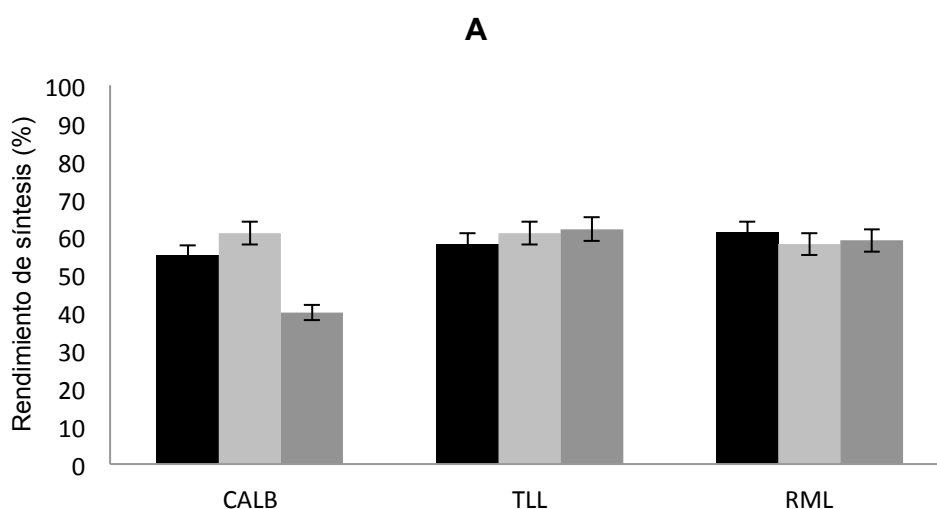
La estructura y composición de los AG que forman los TG afectan a su absorción y distribución en el organismo (Mu and Porsgaard 2005). Por ello, hay interés nutricional en la producción de lípidos estructurados hipocalóricos que contengan AG de cadena media en las posiciones 1 y 3 del TG y AG de cadena larga en la posición 2 (MLM). A estos lípidos se les atribuyen beneficios inmunológicos y una mejora en la eliminación de los lípidos de la sangre (Xu, Høy et al. 1997). Los ácidos grasos que se encuentren en la posición dos de estos TG se absorben más fácilmente que los de otros TG con composiciones de ácidos grasos similares pero con una distribución al azar (Christensen, Hoy et al. 1995). Además, la hidrólisis del TG para la absorción intestinal es más rápida que en los aceites originales (Straarup and Hoy 2000). El que fuera el ácido graso largo un PUFA sería un valor añadido ya que además de prevenir la obesidad causada por una dieta rica en grasas (Takeuchi, Kasai et al. 2002, Kasai, Nosaka et al. 2003) aportaría los beneficios cardiovasculares y neurológicos del EPA y DHA. Nosotros en primer lugar para ver si era posible nuestro propósito probamos la reacción con trioleína como TG de partida en vez de nuestros TG ricos en AGPI obtenidos en el apartado anterior. Se estudió la reacción enzimática de trioleína con diferentes derivados del ácido caprílico (ácido caprílico directamente, ester metílico del ácido caprílico o tricaprilina) para obtener aceites hipocalóricos de tipo ABA, siendo A el ácido caprílico y B el ácido oleico. Estudiamos el comportamiento de la reacción de formación de lípidos hipocalóricos con diferentes lipasas (CALB, RML y TLL) inmovilizadas en soportes de tipo acrílico, ya que se trata de una reacción en medio anhidro y hay muy pocos soportes que puedan utilizarse bajo estas condiciones.

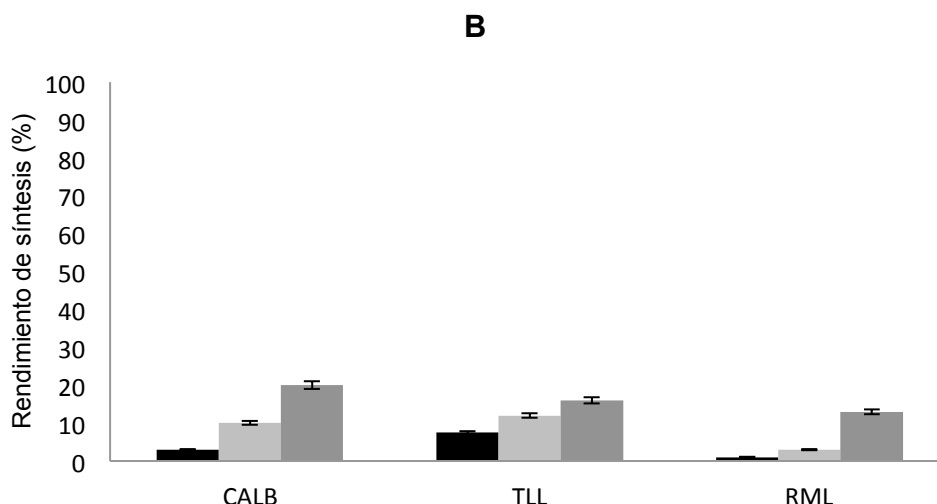


**Figura 5.9.-** Interesterificación de trioleína con ácido caprílico, ester metílico del ácido caprílico o tricaprilina.

### 5.2.1.- Efecto del donador de acilo en la síntesis enzimática de lípidos estructurados catalizada por lipasas inmovilizadas.

Comenzamos el estudio viendo como influían el uso de tres donadores de acilo con diferente reactividad en la reacción. Inmovilizamos las tres lipasas en una resina acrílica de tipo hidrofóbico (Sepabeads C18), de forma que el centro activo quedase permanentemente abierto y se podría esperar una mayor actividad y estabilización frente al medio. La relación molar escogida fue de 1:1 mmolar, TO (Tri Oleico): AC (ácido caprílico), EMAC (éster metílico del ácido caprílico) o TC (Tri Caprílico). Analizamos por separado la formación de mono-caprílico y di-caprílico a las 24 horas de reacción como se recoge en la figura 5.9. Si nos fijamos en el rendimiento de la reacción para el monocaprílico, figura 5.9 A, con las tres enzimas obtenemos unos valores similares, en torno al 60% con los tres sustratos empleados, excepto en el caso de CALB y TC que sólo se logra obtener un 40%. Los mejores resultados se obtuvieron con TLL y TC como sustrato y con CALB y EMAC como sustrato. Si analizamos la obtención de dicaprílico que es lo que más nos interesaría ya que cuantos más caprílicos tenga el triglicérido más hipocalórico será, sí que observamos mayores diferencias según el donador de acilo empleado para las tres lipasas. En todos los casos obtenemos un mayor rendimiento de síntesis de dicaprílico cuando empleamos como sustrato el TC, seguido por el EMAC, y los peores rendimientos se obtienen con el AC. Como se puede ver en la figura 5.9 B los mejores resultados fueron para CALB y TC, con un rendimiento del 20%.





**Figura 5.10.-** Rendimiento máximo de síntesis del mono-caprílico (A) y di-caprílico (B) según la enzima y sustrato utilizado. Soporte Sepabeads C18, 50°C, 24h de reacción, 1 g de catalizador, 1:1 relación molar. Barra negra AC, gris EMAC y gris oscura TC.

Además de ver el rendimiento máximo de la reacción analizamos la velocidad de formación del dicaprílico en las primeras horas de la reacción (tabla 5.1) corroborando que con el ácido caprílico obtenemos de forma más lenta el dicaprílico, seguido por el EMAC y por el TC, siendo el sustrato más favorable para la obtención de dicho producto para nuestras tres enzimas. Además se ve cómo con TLL la velocidad es mucho mayor que para las otras dos lipasas, mejorandola en 14 veces respecto a RML y 140 veces respecto a CALB.

	VELOCIDAD INICIAL		
	AC	EMAC	TC
<b>TLL</b>	0,1	0,15	28
<b>CALB</b>	0,05	0,1	0,2
<b>RML</b>	0,017	0,033	2

**Tabla 5.1.-** Velocidad inicial de síntesis de dicaprílico para las diferentes lipasas inmovilizadas en Sepabeads C18. Condiciones de reacción: 50°C, 1 g catalizador, 1:1 relación molar. La velocidad inicial se calcula como el rendimiento de formación de dicaprílico formado por hora.

### 5.2.2.- Estudio de las condiciones de reacción en la interesterificación de trioleína con tricaprilina catalizada por TLL-Sepabeads C18.

Después de comprobar que los mejores resultados en cuanto a velocidad de síntesis los obteníamos con TLL y el donador de acilo TC, proseguimos nuestro estudio variando la temperatura de reacción y la relación molar de los sustratos para ver si éramos capaces de aumentar el rendimiento en dicaprílico. No proseguimos nuestro

estudio con CALB porque aunque obteníamos un rendimiento de síntesis ligeramente superior (20% frente a un 16% con TLL, figura 5.10 B) la velocidad inicial era 140 veces menor, es decir, necesitábamos mucho más tiempo para obtener la misma cantidad de dicaprílico que con TLL.

### 5.2.2.1.- Efecto de la temperatura.

Probamos a variar diez grados por encima y debajo de la temperatura empleada en los análisis previos (50°C) y analizamos si se producían cambios en el rendimiento o velocidad inicial de la reacción.

Como se puede ver en la tabla 5.2 en ambos casos la velocidad inicial disminuye respecto a nuestra temperatura de partida de 50°C en la que obteníamos un valor de 28, siendo más acusado dicho cambio cuando se baja la temperatura a 40°C (13.6) que cuando se sube a 60°C (20.8). También hay cambios en el rendimiento final de síntesis, no tanto para la producción total de dicaprílico que permanecen bastante próximos los valores (entre 17 y 21%), pero sí para el monocaprílico que en ambos casos disminuye, en este caso más acusadamente para 60°C que baja hasta un valor del 55% cuando obteníamos con 50°C un valor del 67%.

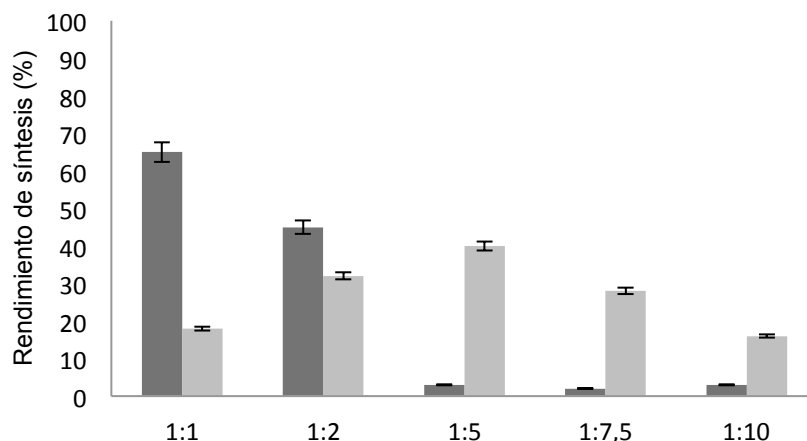
Temperatura (°C)	Velocidad inicial	Rendimiento de síntesis 24h (%)	
		Monocaprílico	Dicaprílico
40	13.6	58	18
50	28	67	17
60	20.8	55	21

**Tabla 5.2.-** Velocidad inicial de síntesis de dicaprílico y rendimiento máximo de síntesis de monocaprílico y dicaprílico para Sepabeads-TLL a las diferentes temperaturas estudiadas. Condiciones de reacción: 1 g de catalizador, 1:1 relación molar TO:TC.

### 5.2.2.2.- Efecto de la relación molar TO:TC.

Probamos también en variar la relación molar de los sustratos, fuimos aumentando la relación de TC respecto a la de TO. Como se puede ver en la figura 5.11 a medida que aumentábamos TC respecto a TO iba aumentando la cantidad de dicaprílico y disminuyendo la de monocaprílico hasta llegar a la relación óptima de 1:5 (TO:TC) en la que obteníamos un 40% de dicaprílico frente a un 3% de monocaprílico, a partir de dicha relación seguía produciéndose más dicaprílico que monocaprílico pero cada vez en menos cantidad, por ejemplo, para una relación 1:7.5 la producción de dicaprílico bajaba a un 28% y con la relación de 1:10 a 16%.





**Figura 5.11.-** Rendimiento máximo de síntesis del monocaprílico (barra negra) y dicaprílico (barra gris) según la relación de TO con el sustrato TC. Soporte TLL-Sepabeads C18, 50°C, 1 g de catalizador.

Por lo que con la variación de relación molar de la reacción conseguimos invertir el rendimiento de síntesis hacia el diglicérido del caprílico, doblando su valor hasta un 40% en estas condiciones.

Hay que destacar además que dicho resultado aunque no se muestren los tiempos en la figura se obtiene con tan sólo media hora de reacción, por lo que dicho factor es crucial a la hora de optimizar nuestras condiciones de reacción.

### 5.2.3.- Efecto de la estrategia de inmovilización en la interesterificación de TO con TC para TLL.

Como en otros capítulos de la tesis, estudiamos como la estrategia de inmovilización puede modular las propiedades de una lipasa y así optimizar un proceso enzimático como el que abordamos en este capítulo. Llevamos a cabo la inmovilización de TLL ahora también de forma iónica a un soporte acrílico cargado positivamente como es el Duolite. Además probamos la reacción con un soporte el soporte comercial de Novozymes para TLL, el cual se suele emplear mucho en este tipo de reacciones. Estudiamos de nuevo tanto el rendimiento máximo de síntesis como la velocidad de la reacción.

En la tabla 5.3 se muestran los resultados, el mejor resultado en cuanto a rendimiento de síntesis fue para Duolite con un valor del 46% frente a un valor del 40% obtenido para Sepabeads, mientras que la velocidad inicial de la reacción fue mejor para Sepabeads C18 llegando hasta un valor de 78 mientras que para Duolite fue de 66, dicha diferencia no es muy significativa ya que esto significa que obtenemos un valor del 40% con Sepabeads en 30min mientras que para obtener el valor del 46% con Duolite necesitamos tan sólo 42min. Por lo que variando nuestra estrategia de

inmovilización hemos vuelto a conseguir incrementar en rendimiento de nuestro producto de interés.

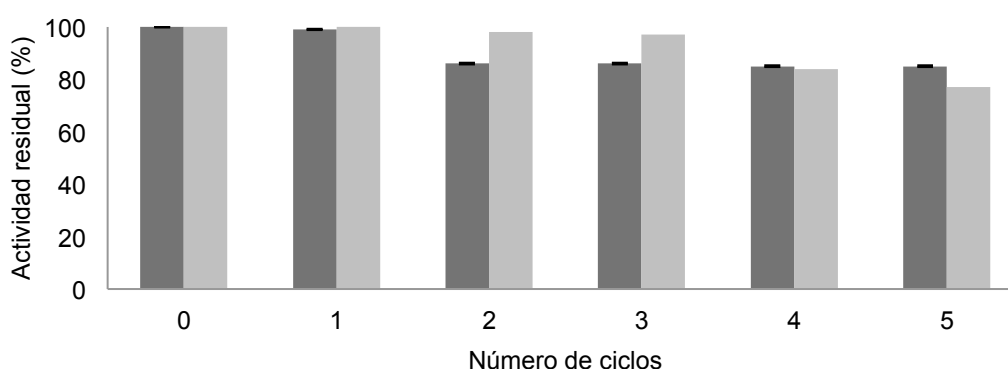
Si nos fijamos en los resultados obtenidos para el catalizador comercial, se obtienen los peores valores en cuanto a velocidad y rendimiento máximo de dicaprílico, obteniendo un 10% menos de producto final respecto a nuestro mejor catalizador en el doble de tiempo.

Catalizador (TLL)	Dicaprílico (%)	Velocidad inicial
Sepabeads C18	40	78
Duolite	46	66
Novozyme	36	36

**Tabla 5.3.-** Velocidad inicial y rendimiento máximo de síntesis de dicaprílico para TLL inmovilizada por diferentes estrategias. Condiciones de reacción: 1 g de catalizador, 1:5 relación molar TO:TC.

#### 5.2.4.- Estabilidad de la interesterificación de trioleína con tricaprilina bajo las condiciones óptimas.

Probamos a realizar varios ciclos de reacción reutilizando el mismo catalizador, TLL-Duolite, para ver su estabilidad. Como se recoge en la figura 5.12 vimos como tras cinco ciclos de reacción el porcentaje de mono y dicaprílico no variaban sustancialmente. De dicaprílico conservamos un 77% del total inicial y de monocaprílico un 85%.



**Figura 5.12.-** Estabilidad en la síntesis del mono (línea negra) y di-caprílico (línea gris) para TLL inmovilizada en duolite, 50°C, 42min de reacción, 1 g de catalizador y relación 1:5 (TO:TC).

#### 5.2.5.- Conclusión/Discusión.

A la vista de estos resultados se puede concluir que para la relación 1:1 los rendimientos de síntesis del TG monocaprílico son mayoritarios y similares para los

tres sustratos y enzimas inmovilizadas en Sepabeads C18, llegándose a alcanzar valores en torno al 60% de producción total, pero en la velocidad de síntesis sí se observan diferencias, siendo mejor para los tres sustratos del caprílico la enzima TLL, lográndose aumentar entre 14 y 140 veces sus valores respecto a las otras dos lipasas. Sin embargo sí que hay claras diferencias en los rendimientos de formación de dicaprílico según el donador de acilo que utilizemos como sustrato, siendo mejor la tricaprilina, seguido por el metil ester y luego por AC para las tres lipasas estudiadas. Esto nos puede sugerir que hay una mejor interacción entre las dos moléculas de TG (trioleína y tricaprilina) que favorecen el intercambio de los ácidos que los componen.

También vemos que la relación de los sustratos escogidos es esencial a la hora de generar uno de los productos mayoritariamente o una mezcla de ambos. Esto se pone de manifiesto cuando ofrecemos a TO el sustrato TC utilizando como catalizador TLL-Sepabeads C18, de modo que a medida que vamos añadiendo TC va disminuyendo la formación de mono y aumentando la de dicaprílico. Al aumentar la cantidad del donador de acilo respecto a TO, el rendimiento en dicaprílico aumenta muy considerablemente invirtiéndose a una determinada concentración (1:5) la relación de productos formados. El mejor rendimiento en dicaprílico fue del 40% con un 4% de monocaprílico en tan sólo media hora para la relación 1:5 (TO:TC), por lo que la relación que se obtiene de síntesis dicaprílico/monocaprílico fue muy buena.

Probamos también a variar la temperatura de la reacción diez grados por encima y por debajo de la temperatura estudiada pero no observamos cambios positivos, por lo que se fijó como temperatura óptima los 50°C.

Bajo las condiciones óptimas inmovilizamos TLL mediante otra estrategia de inmovilización, intercambio iónico, para ver si podíamos modular sus propiedades y poder mejorar aún más nuestros resultados; también comparamos nuestros resultados con un derivado de TLL comercial de la casa Novozymes. Gracias a esto conseguimos obtener la misma relación de productos pero con un mayor rendimiento, un 46% de dicaprílico en tan sólo 42min de reacción, inmovilizando TLL a Duolite mediante intercambio iónico. Esta estrategia dio mejores resultados que la inmovilización hidrofóbica y aún más que el catalizador comercial (se necesitaba el doble de tiempo para obtener un 10% menos de dicaprílico).

El mejor derivado en cuanto a productividad de diglicérido del caprílico y eficiencia resultó además ser muy estable a la temperatura de reacción ya que después de 5 ciclos mantuvo un 85 % de su actividad total de partida por lo que puede ser un buen

candidato a la hora de llevar a cabo esta reacción en repetidas ocasiones a nivel industrial.

Visto esto se puede decir que este método y recursos utilizados pueden ser una buena opción enzimática a la hora de probar en la producción lípidos hipocalóricos con alto contenido en PUFAs.

## CONCLUSIONES

A modo de resumen de la presente Tesis Doctoral quisiéramos resaltar las siguientes conclusiones:

1.- Todas las hipótesis planteadas se confirmaron completamente. Las propiedades catalíticas de diferentes lipasas, derivados (con diferente orientación), modificaciones físico-químicas-genéticas y medios de reacción fueron muy diferentes.

Un ejemplo muy significativo lo obtuvimos al estudiar la etanolisis de aceite de pescado en ausencia de disolventes catalizada por diferentes derivados de TLL, la enzima adsorbida sobre soportes hidrofóbicos era 20 veces más activa que la enzima adsorbida sobre un intercambiador aniónico y casi 1000 veces más activa que el derivado comercial (TLL adsorbida sobre sílica). Además la discriminación a favor de EPA frente a DHA variaba desde 14 para el derivado hidrofóbico hasta 3 para el derivado comercial. Similares resultados se obtuvieron en todas las reacciones estudiadas.

En general los derivados más activos y más estables eran las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos. Muchas veces el recubrimiento adicional de los derivados con PEI mejoraba la estabilidad. Como excepción, TLL adsorbida iónicamente sobre Duolite es el mejor catalizador de interesterificación para obtener lípidos estructurados. En general los derivados preparados en nuestro laboratorio eran mejores que los derivados comerciales de Novozymes que son los más utilizados en Tecnología de Alimentos.

2.- Síntesis de Oleato de ascorbilo. El resultado óptimo fue para CALB adsorbida sobre un soporte hidrofóbico (Novozym 435) y recubierto con PEI, alcanzándose un rendimiento del 85% en comparación con el ácido ascórbico total. El disolvente óptimo fue el t-amil alcohol y la mejor temperatura 45°C. El derivado hidrofóbico de CALB y recubierto con PEI era dos veces más estable que el derivado sin recubrir y conservó el 100% de actividad después de un mes en las condiciones de reacción óptimas.

3.- Hidrólisis de aceite de sardina: mejora de los derivados por modificación genética de BTL. Esta era la única lipasa recombinante en nuestro laboratorio y fue bastante insensible a las modificaciones genéticas y las modificaciones químicas dirigidas. Con el mutante I320C de BTL modificado con naftaleno obtuvimos un valor de velocidad de hidrólisis de aceite de 2.69 que era ligeramente más alto que el de la BTL sin modificar.

4.- Etanolisis con disolventes. TLL adsorbida a Sepabeads C18, en este caso en presencia de ciclohexano, exhibía el mayor valor de selectividad (EPA vs DHA) que fue de 29 y una buena actividad catalítica de 2.2 UI /mg de enzima inmovilizada.

5.- Modificación química de RML. La modificación físico-química de RML nos permitió incrementar con todas las modificaciones la selectividad de EPA frente DHA en la reacción de etanolisis en presencia de solventes, pasando de un valor de 13 para la enzima sin modificar hasta a un valor de 27 mediante modificación por succinilación.

6.- Etanolisis sin disolventes. La actividad del derivado TLL-Sepabeads mejora más de cuatro veces en ausencia de disolventes pero la selectividad es peor. De todos modos TLL es más activa, selectiva y estable cuando la inmovilizamos en Sepabeads C18, mientras que con el derivado comercial obtenemos los peores valores para las tres variables estudiadas. Por otro lado con la Lecitasa obtenemos valores muy bajos de actividad pero sin embargo en ausencia de solvente somos capaces de obtener una selectividad extraordinaria hacia EEPA de 42.6.

7.- Interesterificación de glicerol con ésteres etílicos de DHA. Las lipasas a temperaturas bajas (37°C) sintetizan mayoritariamente sn-2 monoacil derivados incluso en presencia de exceso de etil éster. Por ejemplo RML adsorbida sobre soportes hidrofóbicos a 37°C llega a producir el 98% de sn-2 monoacil DHA en 15 minutos. Analizando cromatográficamente los productos de reacción, se comprobó que el monoglicérido obtenido era el de la posición 2, un derivado de DHA con una excelente biodisponibilidad.

8.- Por otro lado, CALB varía su comportamiento sintético muy notablemente con la temperatura, obteniendo los mejores rendimientos de sn-2 monoacil DHA a 37°C, llegando hasta un 90% del TG a 50 °C.

9.- Síntesis de lípidos estructurados ABA. TLL adsorbida iónicamente sobre Duolite nos dio un mayor rendimiento, un 46% de dicaprílico frente a un 5% de monocaprílico con tan sólo 42min de reacción. Este derivado era mejor que el obtenido por inmovilización hidrofóbica y que el catalizador comercial de Novozymes.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abian, O., V. Grazú, J. Hermoso, R. González, J. L. García, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2004). "Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*: Site-Directed Mutagenesis of the Protein Surface to Increase Multipoint Covalent Attachment." *Applied and Environmental Microbiology* **70**(2): 1249-1251.
- Abian, O., L. Wilson, C. Mateo, G. Fernández-Lorente, J. M. Palomo, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, D. Re, A. Tam and M. Daminatti (2002). "Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **19-20**: 295-303.
- Alcalde, M., F. J. Plou, M. Teresa Martín, I. Valdés, E. Méndez and A. Ballesteros (2001). "Succinylation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Thermoanaerobacter* sp. 501 enhances its transferase activity using starch as donor." *Journal of Biotechnology* **86**(1): 71-80.
- Andersson, M. M. and R. Hatti-Kaul (1999). "Protein stabilising effect of polyethyleneimine." *Journal of Biotechnology* **72**(1-2): 21-31.
- Arroyo, M. (1998). "Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications." *Ars. Pharmaceutica* **39**(2): 23-39.
- Bahulekar, R., N. R. Ayyangar and S. Ponrathnam (1991). "Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts." *Enzyme and Microbial Technology* **13**(11): 858-868.
- Bailey, A. E., D. Swern, T. H. Applewhite and M. W. Formo (1985). *Bailey's Industrial oil and fat products*, Wiley.
- Bailey, A. E., D. Swern and M. W. Formo (1979). *Bailey's Industrial oil and fat products*, Wiley.
- Bays, H. E., A. P. Tighe, R. Sadovsky and M. H. Davidson (2008). "Prescription omega-3 fatty acids and their lipid effects: Physiologic mechanisms of action and clinical implications." *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **6**(3): 391-409.
- Belev, T. N., M. Singh and J. E. McCarthy (1991). "A fully modular vector system for the optimization of gene expression in *Escherichia coli*." *Plasmid* **26**(2): 147-150.
- Bell, G., P. J. Halling, B. D. Moore, J. Partridge and D. G. Rees (1995). "Biocatalyst behaviour in low-water systems." *Trends in Biotechnology* **13**(11): 468-473.
- Bispo, P., I. Batista, R. J. Bernardino and N. M. Bandarra (2014). "Preparation of triacylglycerols rich in omega-3 fatty acids from sardine oil using a *Rhizomucor miehei* lipase: Focus in the EPA/DHA ratio." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **172**(4): 1866-1881.
- Bolivar, J. M., L. Wilson, S. A. Ferrarotti, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente and C. Mateo (2006). "Improvement of the stability of alcohol dehydrogenase by covalent immobilization on glyoxyl-agarose." *Journal of Biotechnology* **125**(1): 85-94.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry* **72**(1-2): 248-254.
- Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim and U. Menge (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." *Nature* **343**(6260): 767-770.
- Breivik, H., G. G. Haraldsson and B. Kristinsson (1997). "Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid." *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**(11): 1425-1429.
- Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar and L. Thim (1991). "A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex." *Nature* **351**(6326): 491-494.
- Buchholz, K. (1979). "Non uniform enzyme distribution inside carriers." *Biotechnology Letters* **1**(11): 451-456.

- Cabrera, Z., G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo and J. M. Guisan (2009). "Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification." *Process Biochemistry* **44**(2): 226-231.
- Cabrera, Z. and J. M. Palomo (2011). "Enantioselective desymmetrization of prochiral diesters catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase." *Tetrahedron: Asymmetry* **22**(24): 2080-2084.
- Calder, P. C. (2003). "N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic." *Lipids* **38**(4): 343-352.
- Carmona, J. M. P. (2003). *Control y modulación de la selectividad de diferentes derivados de lipasas en reacciones de química orgánica en medios macro-acuosos*, Universidad Autónoma de Madrid.
- Carrasco-López, C., C. Godoy, B. De Las Rivas, G. Fernández-Lorente, J. M. Palomo, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, M. Martínez-Ripoll and J. A. Hermoso (2008). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the BTL2 lipase from the extremophilic microorganism *Bacillus thermocatenulatus*." *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* **64**(11): 1043-1045.
- Carrasco-López, C., C. Godoy, B. de las Rivas, G. Fernández-Lorente, J. M. Palomo, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, M. Martínez-Ripoll and J. A. Hermoso (2009). "Activation of bacterial thermo alkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements." *Journal of Biological Chemistry* **284**(7): 4365-4372.
- Carraway, K. L. and D. E. Koshland Jr (1968). "Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **160**(2): 272-274.
- Clark, D. S. and J. E. Bailey (1983). "STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN IMMOBILIZED CHYMOTRYPSIN CATALYSIS." *Biotechnology and Bioengineering* **25**(4): 1027-1047.
- Connor, K. M., J. P. SanGiovanni, C. Lofqvist, C. M. Aderman, J. Chen, A. Higuchi, S. Hong, E. A. Pravda, S. Majchrzak, D. Carper, A. Hellstrom, J. X. Kang, E. Y. Chew, N. Salem, C. N. Serhan and L. E. H. Smith (2007). "Increased dietary intake of [omega]-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis." *Nat Med* **13**(7): 868-873.
- Cowan, D. A. and R. Fernandez-Lafuente (2011). "Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization." *Enzyme and Microbial Technology* **49**(4): 326-346.
- Crexí, V. T., M. L. Monte, M. L. Monte and L. A. A. Pinto (2012). "Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: Chemical hydrolysis and urea complexation." *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **89**(2): 329-334.
- Cunha, A. G., G. Fernández-Lorente, J. V. Bevilacqua, J. Destain, L. M. C. Paiva, D. M. G. Freire, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2008). "Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - A comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques." *Applied Biochemistry and Biotechnology* **146**(1-3): 49-56.
- Chalker, J. M., G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin and B. G. Davis (2009). "Chemical modification of proteins at cysteine: Opportunities in chemistry and biology." *Chemistry - An Asian Journal* **4**(5): 630-640.
- Chen, K. and F. H. Arnold (1993). "Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(12): 5618-5622.
- Christensen, M. S., C. E. Hoy, C. C. Becker and T. G. Redgrave (1995). "Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: Dependence on intramolecular triacylglycerol structure." *American Journal of Clinical Nutrition* **61**(1): 56-61.
- Daniel, R. M. and D. A. Cowan (2000). "Biomolecular stability and life at high temperatures." *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**(2): 250-264.



- Daniel, R. M., M. J. Danson, R. Eisinger, C. K. Lee and M. E. Peterson (2008). "The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications." *Extremophiles* **12**(1): 51-59.
- Daniels, A. D., I. Campeotto, M. W. Van Der Kamp, A. H. Bolt, C. H. Trinh, S. E. V. Phillips, A. R. Pearson, A. Nelson, A. J. Mulholland and A. Berry (2014). "Reaction mechanism of N - acetylneuraminic acid lyase revealed by a combination of crystallography, QM/MM simulation, and mutagenesis." *ACS Chemical Biology* **9**(4): 1025-1032.
- Davis, B. G. (2003). "Chemical modification of biocatalysts." *Current Opinion in Biotechnology* **14**(4): 379-386.
- Derewenda, U., A. M. Brzozowski, D. M. Lawson and Z. S. Derewenda (1992). "Catalysis at the interface: The anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase." *Biochemistry*® **31**(5): 1532-1541.
- DeSantis, G. and J. B. Jones (1999). "Chemical modification of enzymes for enhanced functionality." *Current Opinion in Biotechnology* **10**(4): 324-330.
- Díaz-Rodríguez, A. and B. G. Davis (2011). "Chemical modification in the creation of novel biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology* **15**(2): 211-219.
- Diaz, P., N. Prim and F. I. Javier Pastor (1999). "Direct fluorescence-based lipase activity assay." *Biotechniques* **27**(4): 696-698, 700.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **82**(1): 70-77.
- Ema, T., T. Fujii, M. Ozaki, T. Korenaga and T. Sakai (2005). "Rational control of enantioselectivity of lipase by site-directed mutagenesis based on the mechanism." *Chemical Communications*(37): 4650-4651.
- European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Dietetic Products, N., and Allergies (NDA). (2010). "Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. ." *EFSA J* **8**(3): 1568.
- Faber, K. (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Springer.
- Fernandez-Lafuente, R., P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente and J. M. Guisán (1998). "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports." *Chemistry and Physics of Lipids* **93**(1-2): 185-197.
- Fernandez-Lafuente, R., P. Armisen, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente and J. M. Guisán (1998). "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports." *Chemistry and Physics of Lipids* **93**(1-2): 185-197.
- Fernández-Lafuente, R., V. Rodríguez, C. Mateo, G. Penzol, O. Hernández-Justiz, G. Irazoqui, A. Villarino, K. Ovsejevi, F. Batista and J. M. Guisán (1999). "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **7**(1-4): 181-189.
- Fernandez-Lafuente, R., C. M. Rosell, L. Caanan-Haden, L. Rodes and J. M. Guisan (1999). "Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents." *Enzyme and Microbial Technology* **24**(1-2): 96-103.
- Fernandez-Lorente, G., M. Filice, D. Lopez-Vela, C. Pizarro, L. Wilson, L. Betancor, Y. Avila and J. M. Guisan (2011). "Cross-linking of lipases adsorbed on hydrophobic supports: Highly selective hydrolysis of fish oil catalyzed by RML." *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**(6): 801-807.
- Fernández-Lorente, G., J. M. Palomo, M. Fuentes, C. Mateo, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente (2003). "Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties." *Biotechnology and Bioengineering* **82**(2): 232-237.

- Fernández-Lorente, G., C. Pizarro, D. López-Vela, L. Betancor, A. V. Carrascosa, B. Pessela and J. M. Guisan (2011). "Hydrolysis of fish oil by lipases immobilized inside porous supports." *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**(6): 819-826.
- Fujii, R., Y. Nakagawa, J. Hiratake, A. Sogabe and K. Sakata (2005). "Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity." *Protein Engineering, Design and Selection* **18**(2): 93-101.
- Ganesan, B., C. Brothersen and D. J. McMahon (2014). "Fortification of foods with omega-3 polyunsaturated fatty acids." *Crit Rev Food Sci Nutr* **54**(1): 98-114.
- Gil, A. (2010). *Tratado de nutrición*. España, Ed. Panamericana.
- Godoy, C. A., B. D. L. Rivas, V. Grazú, T. Montes, J. M. Guisán and F. López-Gallego (2011). "Glyoxyl-disulfide agarose: A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins." *Biomacromolecules* **12**(5): 1800-1809.
- Goh, S. H., S. K. Yeong and C. W. Wang (1993). "Transesterification of cocoa butter by fungal lipases: Effect of solvent on 1,3-specificity." *Journal of the American Oil Chemists' Society* **70**(6): 567-570.
- Granados, S., J. L. Quiles, A. Gil and M. C. Ramírez-Tortosa (2006). "Lípidos de la dieta y cáncer." *Nutrición Hospitalaria* **21**: 44-54.
- Grazú, V., O. Abian, C. Mateo, F. Batista-Viera, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2005). "Stabilization of enzymes by multipoint immobilization of thiolated proteins on new epoxy-thiol supports." *Biotechnology and Bioengineering* **90**(5): 597-605.
- Grazú, V., F. López-Gallego, T. Montes, O. Abian, R. González, J. A. Hermoso, J. L. García, C. Mateo and J. M. Guisán (2010). "Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*." *Process Biochemistry* **45**(3): 390-398.
- Grochulski, P., Y. Li, J. D. Schrag and M. Cygler (1994). "Two conformational states of *Candida rugosa* lipase." *Protein Science* **3**(1): 82-91.
- Guisán, J. (1988). "Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes." *Enzyme and Microbial Technology* **10**(6): 375-382.
- Guisan, J. M., G. Alvaro, R. Fernandez-Lafuente, C. M. Rosell, J. L. Garcia and A. Tagliani (1993). "Stabilization of heterodimeric enzyme by multipoint covalent immobilization: Penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*." *Biotechnology and Bioengineering* **42**(4): 455-464.
- Guisan, J. M., P. Sabuquillo, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, C. Mateo, P. J. Halling, D. Kennedy, E. Miyata and D. Re (2001). "Preparation of new lipases derivatives with high activity–stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**(4–6): 817-824.
- Gupta, M. N. and B. Mattiasson (1992). "Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems." *Methods of biochemical analysis* **36**: 1-34.
- Haki, G. D. and S. K. Rakshit (2003). "Developments in industrially important thermostable enzymes: a review." *Bioresource Technology* **89**(1): 17-34.
- Hanefeld, U., L. Gardossi and E. Magner (2009). "Understanding enzyme immobilisation." *Chemical Society Reviews* **38**(2): 453-468.
- Haraldsson, G. G., B. Ö. Gudmundsson and Ö. Almarsson (1995). "The synthesis of homogeneous triglycerides of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase." *Tetrahedron* **51**(3): 941-952.
- Haraldsson, G. G., B. Kristinsson, R. Sigurdardottir, G. G. Gudmundsson and H. Breivik (1997). "The preparation of concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid by lipase-catalyzed transesterification of fish oil with ethanol." *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **74**(11): 1419-1424.
- Hartmeier, W. (1985). "Immobilized biocatalysts - from simple to complex systems." *Trends in Biotechnology* **3**(6): 149-153.

- Hasan, F., A. A. Shah and A. Hameed (2006). "Industrial applications of microbial lipases." *Enzyme and Microbial Technology* **39**(2): 235-251.
- Hausman, C. a. (2010). *La célula*.
- Hayes, D. G. (2004). "Enzyme-catalyzed modification of oilseed materials to produce eco-friendly products." *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **81**(12): 1077-1103.
- Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science.
- Hermes, J. D., S. C. Blacklow and J. R. Knowles (1990). "Searching sequence space by definably random mutagenesis: Improving the catalytic potency of an enzyme." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(2): 696-700.
- Hernandez, K. and R. Fernandez-Lafuente (2011). "Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance." *Enzyme and Microbial Technology* **48**(2): 107-122.
- Hoare, D. G. and D. E. Koshland Jr (1967). "A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins." *Journal of Biological Chemistry* **242**(10): 2447-2453.
- Horton, H. R. (2008). *Principios de bioquímica 4ED*, Pearson Educación.
- Hult, K. and P. Berglund (2003). "Engineered enzymes for improved organic synthesis." *Current Opinion in Biotechnology* **14**(4): 395-400.
- Hunter, J. E. (2001). "Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides." *Lipids* **36**(7): 655-668.
- Illanes, A. (1999). "STABILITY OF BIOCATALYSTS." *Electronic Journal of Biotechnology* **2**: nd-nd.
- Illanes, A. and L. Wilson (2003). "Enzyme reactor design under thermal inactivation." *Critical Reviews in Biotechnology* **23**(1): 61-93.
- Jaeger, K. E. and M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." *Trends Biotechnol* **16**(9): 396-403.
- Jandacek, R. J., J. A. Whiteside, B. N. Holcombe, R. A. Volpenhein and J. D. Taulbee (1987). "The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position." *American Journal of Clinical Nutrition* **45**(5): 940-945.
- Juárez, M. (10-13 09, 2007). "Encuentro de seguridad alimentaria y nutrición. Quinto aniversario de la creación de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición y Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria." *Universidad Internacional Menéndez Pelayo*  
**Mesa redonda sobre "Perspectivas en la seguridad alimentaria y nutrición". "Alimentos funcionales. La evaluación de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos"**
- Jung, S., A. Honegger and A. Plückthun (1999). "Selection for improved protein stability by phage display." *Journal of Molecular Biology* **294**(1): 163-180.
- Jutila, A., K. Zhu, S. A. Patkar, J. Vind, A. Svendsen and P. K. J. Kinnunen (2000). "Detergent-induced conformational changes of Humicola lanuginosa lipase studied by fluorescence spectroscopy." *Biophysical Journal* **78**(3): 1634-1642.
- Kahveci, D. and X. Xu (2011). "Enhancement of activity and selectivity of Candida rugosa lipase and Candida antarctica lipase A by bioimprinting and/or immobilization for application in the selective ethanolysis of fish oil." *Biotechnol Lett* **33**(10): 2065-2071.
- Kasai, M., N. Nosaka, H. Maki, S. Negishi, T. Aoyama, M. Nakamura, Y. Suzuki, H. Tsuji, H. Uto, M. Okazaki and K. Kondo (2003). "Effect of dietary medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **12**(2): 151-160.
- Klibanov, A. M. (1983). "Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts." *Science* **219**(4585): 722-727.
- Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation. *Advances in Applied Microbiology*. **29**: 1-28.

- Klibanov, A. M., N. O. Kaplan and M. D. Kamen (1978). "A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: application to a clostridial hydrogenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(8): 3640-3643.
- Klotz, I. M. (1967). [68] Succinylation. *Methods in Enzymology*. C. H. W. Hirs, Academic Press. **Volume 11**: 576-580.
- Kouker, G. and K. E. Jaeger (1987). "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases." *Applied and Environmental Microbiology* **53**(1): 211-213.
- Kumar, A. and S. Singh (2013). "Directed evolution: Tailoring biocatalysts for industrial applications." *Critical Reviews in Biotechnology* **33**(4): 365-378.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lawrence, R. C., T. F. Fryer and B. Reiter (1967). "Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases [49]." *Nature* **213**(5082): 1264-1265.
- Leckband, D. and R. Langer (1991). "An approach for the stable immobilization of proteins." *Biotechnology and Bioengineering* **37**(3): 227-237.
- Lederberg, E. M. and S. N. Cohen (1974). "Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid." *Journal of Bacteriology* **119**(3): 1072-1074.
- Leresche, J. E. and H. P. Meyer (2006). "Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): Some thoughts of a chemist and of a biotechnologist." *Organic Process Research and Development* **10**(3): 572-580.
- López-Gallego, F., O. Abian and J. M. Guisán (2012). "Altering the interfacial activation mechanism of a lipase by solid-phase selective chemical modification." *Biochemistry* **51**(35): 7028-7036.
- López-Gallego, F., T. Montes, M. Fuentes, N. Alonso, V. Grazu, L. Betancor, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente (2005). "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports." *Journal of Biotechnology* **116**(1): 1-10.
- Luisa Rúa, M., C. Schmidt-Dannert, S. Wahl, A. Sprauer and R. D. Schmid (1997). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity." *Journal of Biotechnology* **56**(2): 89-102.
- Madhavi, D. L., S. S. Deshpande and D. K. Salunkhe (1995). *Food Antioxidants: Technological: Toxicological and Health Perspectives*, Taylor & Francis.
- Marcos, A., C. M. A. Garca, M. D. G. d. S. P. y. Alimentación and I. d. N. y. T. Alimentarios (2007). *Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación*, Dirección General de Salud Pública y Alimentación.
- Marquez, L. D. S., B. V. Cabral, F. F. Freitas, V. L. Cardoso and E. J. Ribeiro (2008). "Optimization of invertase immobilization by adsorption in ionic exchange resin for sucrose hydrolysis." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **51**(3-4): 86-92.
- Martinek, K., A. M. Klibanov, V. S. Goldmacher and I. V. Berezin (1977). "The principles of enzyme stabilization I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multipoint fashion." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **485**(1): 1-12.
- Mataix, J. and A. Gil (2004). "Libro blanco de los omega-3." *Instituto omega-3. Granada, España*: Ed. Puleva Food.
- Mateo, C., O. Abian, M. Bernedo, E. Cuenca, M. Fuentes, G. Fernandez-Lorente, J. M. Palomo, V. Grazu, B. C. C. Pessela, C. Giacomini, G. Irazoqui, A. Villarino, K. Ovsejevi, F. Batista-Viera, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisán (2005). "Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins." *Enzyme and Microbial Technology* **37**(4): 456-462.
- Mateo, C., O. Abian, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan (2000). "Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites." *Biotechnology and Bioengineering* **68**(1): 98-105.

- Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and Microbial Technology* **40**(6): 1451-1463.
- Mateo, C., J. M. Palomo, M. Fuentes, L. Betancor, V. Grazu, F. López-Gallego, B. C. C. Pessela, A. Hidalgo, G. Fernández-Lorente, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán (2006). "Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins." *Enzyme and Microbial Technology* **39**(2): 274-280.
- Messias, J. M., B. Z. da Costa, V. M. G. de Lima, R. F. H. Dekker, M. I. Rezende, N. Krieger and A. M. Barbosa (2009). "Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources." *Enzyme and Microbial Technology* **45**(6-7): 426-431.
- Molloy, S., J. Nikodinovic-Runic, L. B. Martin, H. Hartmann, F. Solano, H. Decker and K. E. O'Connor (2013). "Engineering of a bacterial tyrosinase for improved catalytic efficiency towards D-tyrosine using random and site directed mutagenesis approaches." *Biotechnology and Bioengineering* **110**(7): 1849-1857.
- Montes, T., V. Grazu, F. López-Gallego, J. A. Hermoso, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente (2006). "Chemical modification of protein surfaces to improve their reversible enzyme immobilization on ionic exchangers." *Biomacromolecules* **7**(11): 3052-3058.
- Moreno-Perez, S., M. Filice, J. M. Guisan and G. Fernandez-Lorente (2013). "Synthesis of ascorbyl oleate by transesterification of olive oil with ascorbic acid in polar organic media catalyzed by immobilized lipases." *Chemistry and Physics of Lipids* **174**: 48-54.
- Moreno-Pérez, S., J. M. Guisan and G. Fernandez-Lorente (2014). "Selective ethanolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases." *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **91**(1): 63-69.
- Moreno-Perez, S., P. Luna, F. J. Señorans, J. M. Guisan and G. Fernandez-Lorente (2015). "Enzymatic synthesis of triacylglycerols of docosahexaenoic acid: Transesterification of its ethyl esters with glycerol." *Food Chemistry* **187**: 225-229.
- Morrison, D. A. (1977). "Transformation in Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells." *Journal of Bacteriology* **132**(1): 349-351.
- Mu, H. and T. Porsgaard (2005). "The metabolism of structured triacylglycerols." *Progress in Lipid Research* **44**(6): 430-448.
- Munro, I. A. and M. L. Garg (2013). "Dietary supplementation with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and weight loss in obese adults." *Obesity Research & Clinical Practice* **7**(3): e173-e181.
- Muñoz, M. d. M., L. Esteban, A. Robles, E. Hita, M. J. Jiménez, P. A. González, B. Camacho and E. Molina (2008). "Synthesis of 2-monoacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids by ethanolysis of fish oil catalyzed by 1,3 specific lipases." *Process Biochemistry* **43**(10): 1033-1039.
- Nelson D. L., C. M. M. (2006). *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Barcelona. España, Omega.
- Neubronner, J., J. P. Schuchardt, G. Kressel, M. Merkel, C. Von Schacky and A. Hahn (2011). "Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters." *European Journal of Clinical Nutrition* **65**(2): 247-254.
- Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt (1988). "Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250." *Electrophoresis* **9**(6): 255-262.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kähler and G. Antranikian (1999). "Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application." *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**(6): 711-729.
- Ó'Fágáin, C. (2003). "Enzyme stabilization - Recent experimental progress." *Enzyme and Microbial Technology* **33**(2-3): 137-149.



- Okada, T. and M. T. Morrissey (2007). "Production of n - 3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis." *Food Chemistry* **103**(4): 1411-1419.
- Palomo, J. M., G. Fernández-Lorente, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente (2007). "Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination." *Advanced Synthesis and Catalysis* **349**(7): 1119-1127.
- Palomo, J. M., M. Fuentes, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, J. M. Guisan and R. Fernández-Lafuente (2003). "General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality." *Biomacromolecules* **4**(1): 1-6.
- Palomo, J. M., R. L. Segura, G. Fernández-Lorente, M. Pernas, M. L. Rua, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente (2004). "Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports." *Biotechnology Progress* **20**(2): 630-635.
- Pennisi, E. (1997). "In industry, extremophiles begin to make their mark." *Science* **276**(5313): 705-706.
- Pereira, M. G., F. D. A. Facchini, L. E. C. Filó, A. M. Polizeli, A. C. Vici, J. A. Jorge, G. Fernandez-Lorente, B. C. Pessela, J. M. Guisan and M. d. L. T. d. M. Polizeli (2015). "Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry." *Process Biochemistry* **50**(4): 561-570.
- Pérez, D., S. Martín, G. Fernández-Lorente, M. Filice, J. M. Guisán, A. Ventosa, M. T. García and E. Mellado (2011). "A novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA)." *PLoS ONE* **6**(8).
- Perl, D., U. Mueller, U. Heinemann and F. X. Schmid (2000). "Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein." *Nature Structural Biology* **7**(5): 380-383.
- Persson, M., L. Bülow and K. Mosbach (1990). "Purification and site-specific immobilization of genetically engineered glucose dehydrogenase on thiopropyl-sepharose." *FEBS Letters* **270**(1-2): 41-44.
- Reetz, M. T., D. Kahakeaw and R. Lohmer (2008). "Addressing the numbers problem in directed evolution." *ChemBioChem* **9**(11): 1797-1804.
- Reetz, M. T., S. Prasad, J. D. Carballeira, Y. Gumulya and M. Bocla (2010). "Iterative saturation mutagenesis accelerates laboratory evolution of enzyme stereoselectivity: Rigorous comparison with traditional methods." *Journal of the American Chemical Society* **132**(26): 9144-9152.
- Reyes-Duarte, D., N. Lopez-Cortes, P. Torres, F. Comelles, J. L. Parra, S. Peña, A. V. Ugidos, A. Ballesteros and F. J. Plou (2011). "Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL im using triglycerides as acyl donors." *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* **88**(1): 57-64.
- Rodrigues, R. C., O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente (2014). "Amination of enzymes to improve biocatalyst performance: Coupling genetic modification and physicochemical tools." *RSC Advances* **4**(72): 38350-38374.
- Rodrigues, R. C., Á. Berenguer-Murcia and R. Fernandez-Lafuente (2011). "Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes." *Advanced Synthesis and Catalysis* **353**(13): 2216-2238.
- Rolli, V., M. O'Farrell, J. Ménissier-de Murcia and G. De Murcia (1997). "Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching." *Biochemistry* **36**(40): 12147-12154.
- Rua, M. L., H. Atomí, C. Schmidt-Dannert and R. D. Schmid (1998). "High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol* **49**(4): 405-410.

- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanguansri, L., Z. Shen, R. Weerakkody, M. Barnes, T. Lockett and M. A. Augustin (2013). "Omega-3 fatty acids in ileal effluent after consuming different foods containing microencapsulated fish oil powder - an ileostomy study." *Food & Function* **4**(1): 74-82.
- Schmidt-Dannert, C., M. L. Rúa, H. Atomi and R. D. Schmid (1996). "Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1301**(1-2): 105-114.
- Schmidt-Dannert, C., H. Sztajer, W. Stöcklein, U. Menge and R. D. Schmid (1994). "Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1214**(1): 43-53.
- Shahidi, F. (2005). *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6 Volume Set, Wiley.
- Shahidi, F. and U. N. Wanasundara (1998). "Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies." *Trends in Food Science & Technology* **9**(6): 230-240.
- Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee (2001). "Production, purification, characterization, and applications of lipases." *Biotechnol Adv* **19**(8): 627-662.
- Sharma, R., S. K. Soni, R. M. Vohra, L. K. Gupta and J. K. Gupta (2002). "Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1." *Process Biochemistry* **37**(10): 1075-1084.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance." *Advanced Synthesis and Catalysis* **349**(8-9): 1289-1307.
- Shenoy, A. R. and S. S. Visweswariah (2003). "Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA." *Analytical Biochemistry* **319**(2): 335-336.
- Simopoulos, A. P. (2006). "Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases." *Biomed Pharmacother* **60**(9): 502-507.
- Soares, C. M., V. H. Teixeira and A. M. Baptista (2003). "Protein Structure and Dynamics in Nonaqueous Solvents: Insights from Molecular Dynamics Simulation Studies." *Biophysical Journal* **84**(3): 1628-1641.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *Journal of Molecular Biology* **98**(3): 503-508, IN503-IN505, 509-517.
- Spiteller, G. (1998). "Linoleic acid peroxidation--the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein--and its relationship to chronic diseases." *Chem Phys Lipids* **95**(2): 105-162.
- Srere, P. A. and K. Uyeda (1976). [2] Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices. *Methods in Enzymology*. **44**: 11-19.
- Srigley, C. T. and J. I. Rader (2014). "Content and Composition of Fatty Acids in Marine Oil Omega-3 Supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**(29): 7268-7278.
- Stamatis, H., V. Sereti and F. N. Kolisis (2001). "Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media." *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* **11**(4-6): 323-328.
- Straarup, E. M. and C. E. Hoy (2000). "Structured lipids improve fat absorption in normal and malabsorbing rats." *Journal of Nutrition* **130**(11): 2802-2808.
- Takeuchi, H., M. Kasai, N. Taguchi, H. Tsuji and M. Suzuki (2002). "Effect of triacylglycerols containing medium-and long-chain fatty acids on serum triacylglycerol levels and body fat in college athletes." *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* **48**(2): 109-114.
- Teso Vilar E., B. G. P. C. V. R. M. S. D. E. L. C. D. T. V. (2013). *QUÍMICA ORGÁNICA AVANZADA*, UNED.
- Tischer, W. and V. Kasche (1999). "Immobilized enzymes: Crystals or carriers?" *Trends in Biotechnology* **17**(8): 326-335.

- Torres, R., C. Mateo, M. Fuentes, J. M. Palomo, C. Ortiz, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisan, A. Tam and M. Daminati (2002). "Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: Optimization of the biocatalyst's stability." *Biotechnology Progress* **18**(6): 1221-1226.
- Torres, R., B. C. C. Pessela, C. Mateo, C. Ortiz, M. Fuentes, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente (2004). "Reversible immobilization of glucoamylase by ionic adsorption on sepabeads coated with polyethyleneimine." *Biotechnology Progress* **20**(4): 1297-1300.
- Valenzuela, A., B. J. Sanhueza and S. Nieto (2006). "Docosahexaenoic acid (DMA), essentiality and requirements: Why and how to provide supplementation." *Grasas y Aceites* **57**(2): 229-237.
- Valenzuela, A., V. Valenzuela, J. Sanhueza and S. Nieto (2005). "Effect of supplementation with docosahexaenoic acid ethyl ester and sn-2 docosahexaenyl monoacylglyceride on plasma and erythrocyte fatty acids in rats." *Annals of Nutrition and Metabolism* **49**(1): 49-53.
- Verdú, J. M. (2004). *Libro blanco de los Omega-3: los ácidos grasos poliinsaturados Omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*, Editorial Médica Panamericana.
- Verdú, J. M. (2009). *Nutrición y alimentación humana*. Madrid.
- Verger, R. (1997). "'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts." *Trends in Biotechnology* **15**(1): 32-38.
- Wilkinson, A. J., A. R. Fersht, D. M. Blow and G. Winter (1983). "Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: Tyrosyl-tRNA synthetase cysteine-35 to glycine-35 mutation." *Biochemistry* **22**(15): 3581-3586.
- Williams, G. J., A. S. Nelson and A. Berry (2004). "Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences." *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**(24): 3034-3046.
- Windle, C. L., M. Müller, A. Nelson and A. Berry (2014). "Engineering aldolases as biocatalysts." *Current Opinion in Chemical Biology* **19**(0): 25-33.
- Wohlgemuth, R. (2010). "Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry." *Current Opinion in Biotechnology* **21**(6): 713-724.
- Wong, D. W. S. and P. L. Lorenzo (1994). *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*, Acribia.
- Wong, T. S., F. H. Arnold and U. Schwaneberg (2004). "Laboratory Evolution of Cytochrome P450 BM-3 Monooxygenase for Organic Cosolvents." *Biotechnology and Bioengineering* **85**(3): 351-358.
- Woodley, J. M. (2008). "New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener." *Trends in Biotechnology* **26**(6): 321-327.
- Xu, X. (2000). "Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: A review." *European Journal of Lipid Science and Technology* **102**(4): 287-303.
- Xu, X., C.-E. Høy, S. Balchen, J. Adler-Nissen, X. Xu, C.-E. Høy, S. Balchen and J. Adler-Nissen (1997). Specific-structured lipids: nutritional perspectives and production potentials. *Proceedings of International Symposium on the Approaches to Functional Cereals and Oils*. Beijing, CCOA: 806-813.
- Yan, Y., U. T. Bornscheuer and R. D. Schmid (1999). "Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters." *Biotechnology Letters* **21**(12): 1051-1054.
- Yuan, L., I. Kurek, J. English and R. Keenan (2005). "Laboratory-directed protein evolution." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**(3): 373-392.
- Zaks, A. (2001). "Industrial biocatalysis." *Current Opinion in Chemical Biology* **5**(2): 130-136.
- Zaks, A. and A. J. Russell (1988). "Enzymes in organic solvents: properties and applications." *Journal of Biotechnology* **8**(4): 259-269.
- Zhang, W., Y. Liu, H. Zheng, S. Yang and W. Jiang (2005). "Improving the activity and stability of GL-7-ACA acylase CA130 by site-directed mutagenesis." *Applied and Environmental Microbiology* **71**(9): 5290-5296.